

Ulrich Krefting

**EINE METHODE ZUR LYMPHOZYTENSTIMULATION
MIT PHYTOHÄMAGGLUTININ (PHA)**

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung
für Hämatologie und Onkologie
(Leiter: Prof.Dr.G.Schellong)
der Kinderklinik
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

EINE METHODE ZUR LYMPHOZYTENSTIMULATION
MIT PHYTOHÄMAGGLUTININ (PHA)

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fachbereiche

5 Vorklinische und Theoretische Medizin und
6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Ulrich Krefting
aus Altena (Märkischer Kreis)

1980



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Prof. Dr. H. Themann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schellong
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Cl. Sorg

Tag der Promotion: 10. 3. 1981

Aus der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Kinderklinik
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Referent: Prof. Dr. G. Schellong

Eine Methode zur Lymphozytenstimulation mit Phytohämagglutinin (PHA)

Ulrich Krefting

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine Methode zur Phytohämagglutinin Stimulation von Lymphozyten zu entwickeln, mit der bei guter Reproduzierbarkeit möglichst hohe Stimulationsraten, gemessen durch die Inkorporation von ^3H -Thymidin, erzielt werden sollten. Die Untersuchungen erfolgten in der Zeit von 1974 bis 1976 in der Universität-Kinderklinik Münster. Die Zählung der mit ^3H -Thymidin markierten Kulturen wurde im Szintillationszähler der Universitäts-Hautklinik Münster vorgenommen. Wegen der zu Anfang wiederholt benötigten Mengen Spenderblut wurden die Versuche mit gesunden Erwachsenen (15 Männer, 12 Frauen) im Alter von 19 bis 43 Jahren durchgeführt.

Die Lymphozytenseparation wurde nach der Methode von Böyum (2) vorgenommen. Die gewonnenen Lymphozyten wurden mit Kulturmedium bei einem Gesamtvolumen von 0,2 ml pro Kultur auf Falcon MicroTest II Kulturplatten angesetzt.

Aufgrund unserer Untersuchungen ergaben sich bei einer Lymphozytenzahl von 200.000 pro Ansatz optimale Bedingungen.

Nach Stimulation der Kulturen mit PHA (Wellcome Research Laboratories, lot K8463) folgte die Inkubation bei 37 Grad Celsius unter Normalatmosphäre.

Maximale Stimulationsraten fanden wir bei einer PHA-Konzentration von 0,1 μg , die den Kulturansätzen jeweils in einem Volumen von 10 Mikrolitern zugegeben wurde.

Als günstigste Stimulationszeit erwies sich eine Inkubationsdauer von insgesamt 72 Stunden.

Mehrere Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurde den Kulturen ^3H -Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham/England, Tra. 120, Batch 120) in einem Volumen von 10 Mikrolitern zugesetzt.

Wir ermittelten eine maximale Lymphozytentransformation nach einer 5-stündigen Einwirkzeit von ^3H -Thymidin.

Als für unsere Kulturbedingungen günstigste ^3H -Thymidinkonzentration ergab sich 1 uCi pro Ansatz.

Tag der Promotion: 10. 3. 1981

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. <u>Lymphozytenstimulation durch Mitogene</u>	3
2.2. <u>Methoden der Lymphozytenstimulation</u> <u>durch Phytohämagglutinin (PHA)</u>	11
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	18
3.1. <u>Problemstellung</u>	18
3.2. <u>Untersuchungsdurchführung und Testpersonen</u>	19
3.3. <u>Methoden</u>	20
3.4. <u>Ergebnisse</u>	28
3.4.1. Statistische Berechnungen	28
3.4.2. Lymphozytenseparationstechnik	30
3.4.3. Zellabsterberate während der Versuchs- durchführung	30
3.4.4. Bestimmung der Lymphozytenanzahl pro Kultur	33
3.4.5. Ermittlung einer optimalen PHA-Konzentration	46
3.4.6. Untersuchungen zur Gesamtinkubationsdauer	56
3.4.7. Abhängigkeit des Versuchsergebnisses von der ³ H-Thymidinkonzentration	64
3.4.8. Bestimmung der Einwirkzeit von ³ H-Thymidin	68
3.4.9. Unterschiede zwischen Inkubation unter 5 %- iger CO ₂ -Atmosphäre und unter Normal- atmosphäre	71
3.4.10. Verwendbarkeit von 10 Tage zuvor angesetztem RPMI 1640	72
3.4.11. Reproduzierbarkeit	73

4.	DISKUSSION	74
5.	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83
7.	LEBENS LAUF	92

Meinen Eltern gewidmet

1. EINLEITUNG

Die Lymphozyten des periphären Blutes einer Reihe von Tierarten und des Menschen können durch Substanzen, die als Mitogene oder transformierende Agentien bekannt sind, dazu angeregt werden, sich zu differenzieren und zu teilen (6,16,22,40,41).

Zu diesen Substanzen gehören Lectine, unter anderem die unspezifischen Pflanzenwirkstoffe Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) und Pokeweed Mitogen (PWM) (20). Dieses Verhalten wird zu Grunde gelegt, um durch Lymphozytentransformationsteste als Parameter der zellulären Immunreaktion die funktionellen Veränderungen der Blutlymphozyten bei Leukämie- und Tumorpatienten während der Behandlungszeit und den Immunglobulingehalt des Serums zu prüfen (33, 34).

Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert einen hohen Prozentsatz der Leukozyten der meisten Lebewesen (50). Deshalb wird es in vielen Testverfahren zur Kontrolle des zellständigen Immunsystems verwendet.

Um bei Auswertung der Testergebnisse möglichst zuverlässige Resultate zu erhalten, ist zu fordern, daß sich Testkulturen mit PHA deutlich von Kontrollansätzen ohne PHA unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit wird durchgeführt, um durch methodische Verfeinerung eines Lymphozytentransformationstestes mit PHA möglichst signifikante Differenzen zwischen PHA-stimulierten Kulturen und Kontrollansätzen ohne PHA zu erhalten. Dabei wird versucht, durch Variation der Versuchsparameter wie

- 1) Lymphozytenanzahl
- 2) Konzentration von PHA
- 3) Inkubationszeit
- 4) ^3H - Thymidin - Konzentration
- und 5) Inkorporationszeit von ^3H - Thymidin

möglichst hohe Stimulationsraten im Vergleich zu mitlaufenden unstimulierten Kontrolltesten zu erzielen.

Insgesamt werden ca. 2.600 Einzelergebnisse berücksichtigt werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Lymphozytenstimulation durch Mitogene

Sowohl humorale als auch zelluläre Immunität hängen ab von der Aktivität der kleinen Lymphozyten, die ehemals aus Knochenmarkszellen hervorgegangen sind (14).

Durch neonatale Thymektomie wird die Entwicklung immunologischer Reaktionen, wie Überempfindlichkeitsreaktionen des zellulären Immunsystems und ebenso die humorale Antikörperproduktion auf gewisse Antigene hin, verhindert (28). Doch wirkt sich dies mehr auf die zelluläre als auf die humorale Immunität aus (31).

Bei den Vögeln ist die Antikörperproduktion von der Bursa Fabricii abhängig, ein rundes oder birnenförmiges dorsales Divertikel an der Hinterwand der Kloake. Trotz intensiver Überprüfung aller Arten von Organen wie z.B. Tonsillen, Appendix und der Peyerschen Platten findet sich bei den Säugetieren keines, welches der Bursa wirklich analog wäre (19, 31).

Auf Grund ihrer Ontogenese, Funktion und Oberflächenbeschaffenheit können die Lymphozyten in thymus-abhängige (T) und thymus-unabhängige (B) Lymphozyten eingeteilt werden (11).

Die beiden Populationen unterscheiden sich in ihrer Verteilung und ihrer Lebensdauer. Die T - Lymphozyten gehören dem Hauptteil (60 bis 80 %) der rezirkulierenden Lymphozyten an und haben eine relativ große Halbwertszeit. Sie finden sich im Bereich der parakortikalen Zonen des lymphatischen Gewebes und im Bereich der weißen Milzpulpa.

Die B - Lymphozyten, die etwa 20 % der Lymphozyten des peripheren Blutes darstellen, haben eine relativ kurze Lebensspanne und liegen hauptsächlich im Bereich der Keimzentren der Follikel der Lymphknoten sowie im Bereich der roten Milzpulpa (15, 39).

B - und T - Lymphozyten zeichnen sich durch zum Teil völlig unterschiedliche immunologische Fähigkeiten aus.

Die T - Zellpopulation ist in erster Linie zuständig für die zellbedingte Immunreaktion, d.h. für die Lymphotoxizität und die allergische Reaktion vom verzögerten Typ.

Den B - Zellen wird die Bildung humoraler Antikörper - unter Kooperation von T-Zellen - und die Primärantwort des B - Immunzellen - Systems, die sogenannte Sofortreaktion, zugeschrieben (7, 37).

T - Lymphozyten von Mäusen besitzen das sog. θ - Antigen, das für die B - Lymphozyten nicht nachgewiesen werden konnte (42).

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen menschlichen T - und B - Lymphozyten stellt die Fähigkeit der T - Lymphozyten dar, mit Schafserythrozyten unter Inkubation bei + 4 Grad Celsius sog. Rosetten zu bilden, bedingt durch einen speziellen Rezeptor für Schafserythrozyten an ihrer Oberfläche (10).

Demgegenüber gelingt der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von Immunglobulin an der Oberflächenmembran als wichtigstes Merkmal für die Charakterisierung der B - Lymphozyten. Darüber hinaus besitzen B- Zellen Rezeptoren für die C 3 - Komponente des Komplements und für das Fc - Stück des IgG (15).

Nach I.M. R o i t t u. a. (39) enthalten beide Lymphozytenpopulationen antigensensitive Zellen, wahrscheinlich mit spezifischen Antikörpern an ihrer Oberfläche.

B - Lymphozyten können sich differenzieren, proliferieren und zu Plasmazellen heranreifen, die humorale Antikörper synthetisieren.

Nach Antigen - Kontakt transformieren T - Lymphozyten zu großen Lymphoblasten und teilen sich, sowohl in vivo als auch in Zellkulturen.

R o i t t u. a. (39) schreiben den T - Lymphoblasten, die kein nachweisbares intrazelluläres Immunglobulin besitzen, folgende Funktionen zu :

- a) Sie teilen sich weiter und bilden ausgedehnte Populationen primär antigen-sensitiver Zellen, die wegen ihrer langen Lebensdauer das immunologische Gedächtnis darstellen.
- b) Sie treten als "killer cells" auf, wenn das Antigen eine lebende Zelle ist.
- c) Sie geben eine Reihe von löslichen Faktoren ab, welche die Gefäßpermeabilität erhöhen, wirken auf andere Lymphozyten mitogen und aktivieren Makrophagen. Diese Eigenschaften zusammen mit b) stellen die Grundlage für die Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ und die zelluläre Immunität dar.
- d) Durch Stimulierung der antigen-sensitiven B - Lymphozyten helfen sie bei der immunologischen Reaktion auf gewisse ("thymus-abhängige") Antigene.

Die kooperativen Eigenschaften der T - Lymphoblasten würden nach R o i t t u.a. (39) die oft beobachtete Verwandtschaft zwischen Überempfindlichkeitsreaktionen des zellulären Immunsystems vom verzögerten Typ und die Bildung humoraler Antikörper erklären.

Die Induktion zur Mitose von kleinen Lymphozyten in Zellkulturen und ihre Transformation zu größeren Zellen (Blasten) kann durch spezifische und unspezifische Antigene bewirkt werden (32).

Zu den spezifischen Stimulantien mit Antigencharakter, die in Zellkulturen Verwendung finden, gehört Tuberculin, das nur mit schon sensibilisierten Zellen zu reagieren vermag(44).

Als unspezifische Mitogene werden u.a. angesehen: Phytohämagglutinin (PHA), Staphylokokkenfiltrat, Streptolysin - S, Antilymphozytenserum, Concanavalin A (Con A) und Pokeweed Mitogen (PWM) (20, 39).

Die Tatsache, daß die Stimulation von Lymphozyten durch Mitogene wie PHA und Con A als unspezifische Aktivierung anzusehen ist, ist nach J.D. S t o b o (45) nur in streng immunologischer Sicht gültig.

Nach seinen Untersuchungen gehen beide Mitogene eine gleich gute Verbindung zu Thymozyten - Lymphozyten, die sich noch während ihrer Entwicklung im Thymus befinden -, thymusgereiften (T) und knochenmarksgereiften (B) Populationen ein, eine spezielle Aktivierung tritt jedoch nur bei den T - Lymphozyten ein. Der Grad der immunologischen Antwort scheint abhängig zu sein vom unterschiedlichen Differenzierungsgrad innerhalb des Thymus und der schon herangereiften T - Lymphozyten.

Um das Zusammenspiel zwischen T - und B - Zellen bei der Immunantwort zu erklären gibt es nach A n d e r s s o n u.a.

(1) vier richtungsweisende Hypothesen :

- 1) Die "Faktor Hypothese" nimmt an, daß sowohl T - als auch B - Zellen Antigen binden. Daraufhin werden T - Zellen zu Sekretion eines unspezifischen stimulierenden Faktors veranlaßt. Dieser Faktor soll wiederum B - Zellen aktivieren, auf Antigen mit Zellteilung und Bildung spezifischer Antikörper zu reagieren (9).
- 2) Die "cross- linking Hypothese" fordert zur Aktivierung eine Reaktion zwischen B - Zellen und Antigen, die allein genommen aber insuffizient sein soll. Zusätzlich soll ein Antikörper mit einer anderen Determinante desselben Antigens reagieren, das mit der B - Zelle eine Verbindung eingegangen ist. Dieser Antikörper wird durch Moleküle der T - Zellen dargestellt. Anschließend führt die Bindung zwischen Antigen und B - Zelle zur Transformation (3).
- 3) Die "local concentration Hypothese" schreibt den T - Zellen eine passive Rolle zu. Sie nehmen mit ihren Rezeptoren aus Immunglobulin Antigen auf und führen sie den korrespondierenden Rezeptoren auf den B - Zellen zu. Auf diese Art dienen die T - Zellen lediglich dazu, die Konzentration von Antigen auf den B - Zellen zu erhöhen und die Bindung zwischen Antigen und B - Zellrezeptor zu stabilisieren (29, 30, 47).

- 4) Letztlich wird angenommen, daß der Kontakt zwischen T - und B - Zellen, der durch eine gegenseitige Antigenbindung zustande gekommen ist, auf einer nicht immunologischen Membranverbindung beruht, die aber das Signal Aktivierung darstellt (9).

Durch eine Reihe von Experimenten unterstreichen A n d e r s s o n u. a. (1) die unspezifischen Eigenschaften der T - Zellfunktion bei der Aktivierung von B - Zellen, ohne jedoch spezifische Einflüsse ausschließen zu wollen.

So kann die T - Zellfunktion durch ein unspezifisches B - Zell - Mitogen wie LPS (ein Lipopolysacchrid aus E. coli) in reinen B - Zellkulturen ersetzt werden.

Weiterhin können Con A - aktivierte T - Zellen in vitro als Helfer - Zellen fungieren, ebenso wie Überstände aus gemischten Lymphozytenkulturen die T - Zellen bei der primären Immunantwort in vitro ersetzen.

A n d e r s s o n s u. a. (1) Untersuchungen unterstützen zwei Mechanismen, durch die T - Zellen bei der Aktivierung von B - Zellen in Erscheinung treten :

- 1) T - Zellen sezernieren einen löslichen Faktor, der B - Zellen in die Lage versetzt, auf Antigen zu reagieren.
- 2) T - Zellen konzentrieren Antigen, um es den B - Zellen zuzuführen.

Die Autoren (1) stellen dabei heraus, daß Mitogene als Modellssubstanzen zur Erforschung der Immunozytenaktivierung ihre Berechtigung finden, indem sie B - Zellen sowohl zur

Teilung als auch zur Antikörperproduktion aktivieren. So scheinen die Eigenschaften mitogenaktivierter B - Zellen identisch zu sein mit denen, die durch Antigenkontakt stimuliert werden.

L o h r m a n n u. a. (23) vermuten aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse, daß menschliche T - Lymphozyten direkt durch Stimulantien wie Phytohämagglutinin, Concanavalin A, Pokeweed Mitogen und allogenische Lymphozyten aktiviert werden.

So stimulieren die genannten Mitogene separierte T - Zellen, während T - Zell - freie B - Zellpopulationen nicht proliferieren. In Gegenwart von T - Zellen kommt es dann zur Proliferation der B - Zellen nach Stimulation durch Phytomitogene.

Deshalb erklären L o h r m a n n u. a. (23) die generalisierte Lymphozytenantwort in phytomitogenstimulierten T - und B - Zellkulturen (T + B - Zellkulturen) über eine T - zellvermittelte B - Zellproliferation.

T - Zellaktivierung durch allogenische Lymphozyten erfordert nach L o h r m a n n u. a. die Gegenwart von Monozyten, während die Aktivierung durch Phytomitogene monozytenunabhängig verläuft. Dies setzt einen ausreichenden Kontakt von Mitogenen mit der T - Zelloberfläche voraus, um eine T - Zellproliferation zu bewirken. Jedoch läßt sich auch feststellen, daß in Gegenwart von Monozyten die proliferative Antwort der T - Zellen auf Stimulantien zunimmt, und zwar abhängig von der Anzahl der Monozyten.

Dieser monozytenabhängige Effekt wirkt sich allerdings nur bei geringer Mitogendosierung nachhaltig auf das Gesamtergebnis aus und nimmt bei steigenden Mitogenkonzentrationen auf ein zu vernachlässigendes Minimum ab (23).

Doch sollen beide Mechanismen, die indirekte, monozytenabhängige und die direkte, monozytenunabhängige T - Lymphozytenaktivierung, Erwähnung finden, da sie zur Gesamtreaktion der Lymphozytenstimulation durch Mitogene in Zellkulturen beitragen.

2.2. Methoden der Lymphozytenstimulation durch Phytohämagglutinin (PHA)

Als eine der am häufigsten verwendeten Substanzen mit Antigencharakter, die zur Erforschung immunologischer Zusammenhänge eingesetzt werden, dient PHA.

M i l l e r u. a. (27) haben ausgiebige Untersuchungen über die molekulare Struktur und Eigenschaften der Phytohämagglutinine durchgeführt.

Danach handelt es sich bei den Phytohämagglutininen (PHAP) die aus der roten Schminkebohne, Phaseolus vulgaris, gewonnen werden, um insgesamt fünf verschiedene Isomitogene, die aus tetrameren Strukturen durch zwei verschiedene Glycoprotein-untereinheiten gebildet werden.

Mit einem Molekulargewicht von 34.000 sind alle gleich groß und unterscheiden sich nicht in ihrer Primärstruktur von der 8. bis zur 24. Aminosäureeinheit.

Unterschiede ergeben sich jedoch in 6 der 7 ersten Aminosäuren und in ihren isoelektrischen Punkten.

Das aus vier L - Untereinheiten bestehende Isomitogen (L - PHAP) stellt ein gutes Leukagglutinin und Mitogen dar, dem hämagglutinierende Eigenschaften fehlen.

Demgegenüber ist das aus vier R - Untereinheiten bestehende (4R H - PHAP) ein potentes Hämagglutinin.

Die hybriden Isomitogene (3 L - 1 R, 2 L - 2 R, 1 L - 3 R) vermögen dagegen gemischte Erythrozyten - Lymphozyten - Agglutinationen hervorzurufen.

Die Zellteilung der durch PHA in vitro stimulierten Lymphozyten ist als letzter Schritt einer Reihe von Ereignissen im Zellzyklus anzusehen (13).

In den ersten 5 - 10 Stunden nach Inkubation mit PHA fällt eine Ansammlung von Lymphozyten um Makrophagen auf. Innerhalb der ersten 24 Stunden kommt es zu einem Anschwellen der kleinen Lymphozyten, die eine Umwandlung in größere, morphologisch unreifere Zellen mit einem großen irregulären Zellkern und Vacuolen im Cytoplasma erfahren.

Als früheste Wirkung wurde die vermehrte Synthese von RNA beschrieben, dann von Proteinen und schließlich von DNA (19).

Nach 48 Stunden werden gelegentlich Mitosen beobachtet. 72 Stunden nach Beginn der Inkubation mit PHA scheint sich ein Maximum der Mitoserate einzustellen (24).

Das Ausmaß der Stimulation kann durch Einbau radioaktiv markierten ^3H - Thymidins in die DNA der Lymphozyten gemessen werden (50).

Bei den verschiedenen Methoden zur Lymphozytenstimulation ergeben sich Unterschiede in der Art der :

- a) Lymphozytengewinnung
- b) Zusammensetzung der Lymphozytensuspensionen
(unterschiedliche Gefäße, Medien, Serumzusätze,
PHA - Dosierungen etc.)
- c) Inkubationsdauer mit PHA
- d) Zugabe und Inkorporationszeit von ^3H - Thymidin
- e) Beendigung und Auswertung des eingebauten ^3H - Thymidins

Bezüglich der genannten Parameter weisen viele Arbeiten (6, 13, 17, 20, 35, 36, 41, 46, 50) zum Teil erhebliche Unterschiede auf.

In der Überzeugung, daß die oft stark voneinander differierenden Untersuchungsergebnisse mancher Autoren hauptsächlich methodisch bedingt sind, haben Y a m a m u r a (50) und P e e s & P a p p a s (35) umfangreiche Untersuchungen zur Standardisierung der Variablen durchgeführt.

Da manche der anderen Arbeiten (6, 13, 17, 20, 36, 41, 46) nur Einzelaspekte untersuchen, teils ähnlich, teils überschneidend verfahren, stehen Arbeitsweise und Ergebnisse von Y a m a m u r a (50) und P e e s & P a p p a s (35) stellvertretend für die anderen.

Bei der Lymphozytengewinnung aus peripherem venösen Blut verwendet Y a m a m u r a eine abgewandelte Methode von C o u l s o n & C h a l m e r s (8). Nach Defibrinierung des Blutes mit Glaskugeln folgt die Separation der Lymphozyten durch 3 %-ige Gelatinelösung.

Der lymphozytenreiche Überstand wird zweimal in TC 199 gewaschen und in Glas - Teströhrchen (100 X 12 mm) mit TC 199 und 10%-igem Zusatz von autologem Serum suspendiert. Das Volumen eines Kulturansatzes beträgt dabei 1 ml.

P e e s & P a p p a s führen die Lymphozytenseparation nach Defibrinierung mit Ficoll - Isopaque nach der Methode von B ö y u m (2) durch. Anschließend erfolgt zweimalige Waschung der Lymphozyten mit PBS (phosphate buffered saline)

und die Suspension im Kulturmedium bei einem Endvolumen von 0,2 ml. Die Zusammensetzung des Mediums besteht aus MEM (Eagle's Minimum Essential Medium), ergänzt mit Bicarbonat 2,0 g/l, 100 IU/ml Penicillin, 100 ug/ml Streptomycin, 1,0% nichtessentieller Aminosäuren und Glutamin 2 mM, 10 % autologem Serum.

Der Kulturansatz wird bei P e e s & P a p p a s auf Mikrottestplatten (Nr. 3040, Falcon Plastics) vorgenommen. Nach PHA - Zugabe ziehen beide Untersucher (35, 50) die Inkubation bei 37 Grad Celsius unter Begasung von 5 % CO₂ und 95 % Luft vor.

Bezüglich der Lymphozytenanzahl pro Kulturansatz erreicht Y a m a m u r a ein Stimulationsmaximum bei 2×10^5 Zellen (in 1 ml).

P e e s & P a p p a s ermitteln einen linearen Anstieg der Stimualtionsrate bis zu einer Konzentration von 15×10^5 Zellen pro Kultur (in 0,2 ml).

Y a m a m u r a sieht eine PHA - Stimulation mit einer Dosis von 1 ug/ml (= pro Kulturansatz) als optimal an, während P e e s & P a p p a s in ihrem System eine optimale Dosis - Wirkungskurve für eine PHA - Konzentration von 25 ug PHA / ml Kulturansatz finden (entsprechend 5 ug / Kulturansatz).

Bei Y a m a m u r a beträgt die Gesamtinkubationszeit (= Gesamtstimulationszeit) 48 Stunden.

P e e s & P a p p a s wählen dafür 66 Stunden.

4 Stunden vor Inkubationsende erfolgt bei Y a m a m u r a die ^3H - Thymidinzugabe, P e e s & P a p p a s sehen 16 Stunden vor Ablauf der Inkubation als richtig an.

In Versuchen mit jeweils ansteigenden ^3H - Thymidinkonzentrationen erreicht der Thymidineinbau nach P e e s & P a p p a s ein Plateau bei einem Angebot von mehr als 5,0 ug / ml Kultur. Nach Erreichen des Plateaus (bei höheren Konzentrationen) sank der Einbau auf unter 1 %, während ansonsten 10 - 15 % des eingesetzten Thymidins eingebaut wurden.

Bei Y a m a m u r a nimmt mit Zunahme der ^3H - Thymidinkonzentration die Inkorporation von Thymidin linear bis zu 10 uCi pro Kulturansatz zu.

Bei 100 uCi / Kultur resultiert eine Abnahme des Thymidineinbaus, welche Y a m a m u r a auf die Abtötung von Zellen durch die Strahlenwirkung des Tritiums zurückführt.

Deshalb sieht er, auch im Hinblick auf die Kosten des ^3H - Thymidins, eine Konzentration von 1 uCi / Kultur als richtig an, zumal er sich bei diesem Wert im linearen Bereich der Inkorporationszunahme befindet.

Erhebliche Unterschiede ergeben sich bei Versuchsende.

Y a m a m u r a zentrifugiert die Zellen nach Ablauf der 48 Stunden Inkubationszeit, wäscht sie zweimal mit PBS (phosphate buffered saline, pH 6,8) und resuspendiert sie schließlich in 2 ml PBS. Dann werden 2 ml kalter 10 %-iger Trichloressigsäure hinzugegeben, um die Nukleinsäuren und Proteine zu fällen. Die Präzipitate werden durch

Zentrifugieren gesammelt, zweimal in reinem Methanol gewaschen, um Proteine wie Hämoglobin zu lösen, und dann in 1 ml reinem Methanol suspendiert. Dem werden 9 ml Szintillationsflüssigkeit NE 233 hinzugegeben und alles im Szintillationszähler gemessen.

Die Ergebnisse werden in cpm (counts per minute) ausgegeben.

Demgegenüber ist die Versuchsanordnung von P e e s & P a p p a s mit erheblich geringerem Arbeitsaufwand verbunden.

Durch simultane Aspiration von je 10 Löchern der Microtest - Kulturplatte auf Glasfibreistreifen wird die Inkorporation von ^3H - Thymidin beendet.

Angewendet wird die Apparatur von H a r t z m a n et al. (17). Nach Trocknung der Filterstreifen werden die einzelnen Plättchen herausgelöst, in speziellen Szintillationsgefäßen mit 10 ml Aquasol (NEN) versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler (SL 30 Intertechnique) ausgewertet.

Einen Effekt zusätzlicher Bicarbonatpufferung, indem 10 μl einer 1 %-igen Natriumbicarbonatlösung nach Kulturbeginn zugegeben werden, können P e e s & P a p p a s nicht beobachten.

Bei 100 aufeinanderfolgenden Vierfachbestimmungen nach PHA - Stimulation ermitteln P e e s & P a p p a s einen Variationskoeffizienten, der in 90 Fällen unter 15 % liegt. Ihre Ergebnisse in cpm gemessen liegen zwischen 10.000 und 40.000 Einheiten, die meisten bewegen sich um 20.000.

Bei Y a m a m u r a lassen sich keine so klaren Aussagen machen. In einigen Versuchen liegt die Bewertungsgrundlage bei Werten bis zu 2.000 , bei anderen bis zu 100.000 cpm .

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Problemstellung

Zielsetzung der im folgenden dargelegten Versuche ist es, eine Mikromethode zur Lymphozytenstimulation durch PHA zu entwickeln, die bei möglichst geringem labortechnischem Aufwand durch Ermittlung der Variablen maximale Stimulationsraten ermöglicht und deren Reproduzierbarkeit sich in akzeptablen Grenzen hält.

Hierzu soll die Anzahl von Lymphozyten pro Kulturansatz ermittelt werden, bei der eine maximale Stimulation möglich ist.

Bei ansteigenden PHA - Dosierungen soll eine Dosis - Wirkungskurve festgelegt werden, um die entsprechende optimale PHA- Konzentration zu bestimmen.

Bei welcher Gesamtinkubationsdauer ergeben sich maximale Stimulationsraten ?

In welcher Dosierung soll ^3H - Thymidin den Kulturansätzen zugesetzt werden, um korrekte Messungen der Stimulation zu gewährleisten ?

Welche Einwirkzeit von ^3H - Thymidin ist hierzu notwendig?

Zur Vereinfachung der Versuchsdurchführung interessiert ferner, ob während der Inkubationszeit die Aufrechterhaltung einer 5 %-igen CO_2 - Atmosphäre unumgänglich ist.

Weiterhin soll überprüft werden, ob sich Kulturmedium, das als Trockensubstanz geliefert wird, nach Auflösung nach einem Zeitraum von 10 Tagen noch verwenden läßt ohne nachhaltigen Einfluß auf die Testresultate.

3.2. Untersuchungsdurchführung und Testpersonen

Die Untersuchungen wurden Mitte 1974 bis 1976 in den Laborräumen der Universitäts - Kinderklinik Münster durchgeführt.

Die Auszählung der radioaktiv markierten Zellkulturen erfolgte im Packard Tri - Carb Spectrometer Modell 3380 der Abteilung für Experimentelle Dermatologie der Universitäts - Hautklinik Münster.

Als Testpersonen bzw. Blutspender stellten sich insgesamt 27 gesunde Erwachsene (15 Männer, 12 Frauen) im Alter von 19 bis 43 Jahren zur Verfügung.

Durchgeführt wurden 30 Versuche mit einer durchschnittlichen Inkubationsdauer von 3 Tagen.

Dabei wurden 2.600 Kulturansätze szintigrafisch ausgewertet.

Wegen anfänglich logistischer Schwierigkeiten und zeitweiligen apparativen Ausfällen war die Streubreite in den Ergebnissen der ersten Versuche naturgemäß größer.

Deshalb stellen die später durchgeführten Versuche mit den Versuchsnummern: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29 und 30 die eigentliche Grundlage dieser Untersuchung dar.

(Die Versuche 27 und 28 mißglückten, da jeweils beim letzten Arbeitsgang die Absaugpumpe ausfiel.)

3.3. Methoden

Von den jeweiligen Testpersonen wurden pro Versuch 10 ml venöses Blut abgenommen. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurden 50 IE Heparin (Fa. Gibco, 5.000 IE/ml) pro ml Blut, entsprechend 0,1 ml Heparin auf 10 ml Blut, zugesetzt.

Um Ausgangswerte über die ursprüngliche Zusammensetzung des Blutes zu erhalten, wurde vor Weiterverarbeitung zunächst eine Leukozytenzählung unter Verwendung der Neugebauerschen Zählkammer durchgeführt.

Die Anfertigung eines Blutausstriches (Färbung: May - Grünwald - Giemsa) ließ den prozentualen Anteil von Lymphozyten unter den weißen Blutkörperchen bestimmen. Somit war der Ausgangswert der in 10 ml Blut enthaltenen Lymphozyten errechenbar.

Die Lymphozytenseparation wurde entsprechend der Methode von B ö y u m (2) durchgeführt.

Dazu wurde das entnommene und heparinisierte Blut zunächst mit einem gleich großen Volumen PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2) vermischt und eine Temperatureinstellung auf 18 Grad Celsius im Wasserbad vorgenommen.

In seiner Eigenschaft als Dichtegradient wurde Lymphoprep (Fa. Molter) verwendet, um die Trennung der Lymphozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen des Blutes zu erreichen.

Dementsprechend wurden 2 Teile auf 18 Grad Celsius eingestelltes Lymphoprep mit 3 Teilen der Blut - PBS - Mischung

in sterilen Plastik - Röhrchen (Falcon - Plastic - Tubes Nr. 2001, Fa. Falcon, Oxnard, California) überschichtet und mit Plastikkappen verschlossen.

Durch anschließendes 10 - minütiges Stehenlassen im Wasserbad von 18 Grad Celsius wurde eine exakte Temperatureinstellung gewährleistet.

Wegen der Temperaturabhängigkeit der Methode wurde Wert auf eine genaue Ausgangstemperatur für die Weiterverarbeitung gelegt, da aus logistischen Gründen auf die Verwendung einer Kühlzentrifuge verzichtet wurde.

Statt dessen kam eine normale Zentrifuge zur Anwendung, in der die Plastikröhrchen samt Inhalt bei Zimmertemperatur mit 400 g für 35 Minuten zentrifugiert wurden.

Wegen der meist geringen Differenz zur Umgebungstemperatur ergaben sich dadurch keine Probleme.

Nach dem Zentrifugieren hatten sich in den Plastikröhrchen 3 Schichten gebildet:

- 1.) eine untere Schicht, bestehend aus Erythrozyten und Bestandteilen des Blutes mit einer größeren Dichte als Lymphoprep,
- 2.) eine wässrige, mittlere Schicht aus Lymphoprep mit einem weiß - gelblich durchschimmernden Ring aus Lymphozyten - der sog. Speckschicht -,
- 3.) eine obere Schicht aus Blutplasma.

Mittels einer sterilen silikonisierten Pasteur - Pipette wurde der Lymphozytenring mit der ihn umgebenden Lymphoprep-schicht geerntet und in neu präparierte Plastikröhrchen gegeben, in die bereits etwas Medium (s. u.) vorgelegt war.

Anschließend erfolgte Leukozytenzählung (Neugebauersche Zählkammer) und Differenzierung der Ernte durch Anlegen von Cytocentrifugenpräparaten.

Dazu wurden jeweils 0,2 ml der geernteten Lymphozytensuspensionen auf Objektträger gegeben und für 5 Minuten bei 6.000 RPM zentrifugiert.

Auf diese Weise ließ sich die Effektivität der Methode kontrollieren und die insgesamt gewonnenen Lymphozyten rechnerisch ermitteln, nachdem nach Färbung (May - Grünwald - Giemsa) der Cytocentrifugenpräparate der prozentuale Anteil von Lymphozyten an der Ernte festgestellt worden war.

In den weiteren Phasen der Verarbeitung wurden die Zellsuspensionen wenn möglich mit Eiswasser auf + 4 Grad Celsius gehalten, um die Stoffwechselaktivität zu reduzieren.

Es folgte zweimaliges Waschen in Mediumgemisch, zunächst 10 Minuten bei 400 g (entsprechend 1750 RPM der verwendeten Zentrifuge), dann 10 Minuten bei 200 g (entsprechend 1200 RPM).

Das oft empfohlene dreimalige Waschen wurde nicht nachvollzogen, um den Zellverlust bei dem meist zahlenmäßig geringen Zellvorrat so niedrig wie möglich zu halten. Danach wurden erneut die absoluten Lymphozytenzahlen durch Leukozytenzählung und Auswertung von Cytocentrifugenpräparaten errechnet und die Konzentrationen der erhaltenen Zellsuspensionen bezüglich ihres Lymphozytengehaltes festgestellt.

Die Menge an Kulturmediumgemisch, die entsprechenden Portionen von Lymphozytensuspensionen jeweils zugegeben werden

mußte, um die gewünschten Lymphozytenkonzentrationen in den späteren Kulturansätzen zu erhalten, konnte dann auf einfachem Dreisatzweg errechnet werden.

Als Basis zur Herstellung des Mediumgemisches diente RPMI 1640 (Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y.).

In kleinen Portionen als Trockensubstanz (ohne Bicarbonatzusatz, aber mit L - Glutamin) für 1 Liter Flüssigkeit bezogen, wurde die Substanz zunächst aus Gründen der Osmolarität wegen späterer Zusätze in 880 ml Aqua bidest. aufgelöst und zur Pufferung mit 20 mmol Hepes (bei M = 238,3 entsprechend 4,766 g; Hersteller: Fa. Serva, Heidelberg) versetzt.

Nach Einstellung des Mediums auf einen für Lymphozytenkulturen günstigen pH - Wert von 7,5 wurde durch Mikrofiltration (Filterporengröße : $0,22 \text{ m}^{-6}$) Sterilität erzielt.

Osmolaritätsmessungen ergaben 305 MOsml.

Mit einem Ansatz von RPMI 1640 wurde mengenmäßig genügend Medium hergestellt, um damit mehrere Versuche an verschiedenen Tagen durchzuführen.

Die Ergänzung des Mediumgemisches erfolgte jeweils am Tage der Versuchsdurchführung durch Hinzugabe von, auf das Gesamtvolumen bezogen, 10 % FBS (foetal bovine serum) und 2 % Penicillin (100 units/ml) / Streptomycin (50 ug/ml).

Um eine mögliche Verunreinigung bei der Zubereitung auszuschließen, wurde die gesamte pro Versuch benötigte Menge an Kulturmedium vor Verwendung nochmals mikrofiltriert (Millipore Filter, $0,22 \text{ m}^{-6}$).

Die eigentliche PHA - Stimulation der Lymphozyten wurde auf Falcon 3040 Microtest II Tissue Culture Plates (Fa. Falcon, Oxnard, California 93030) durchgeführt, die pro Platte 96 kleine Vertiefungen mit einem Volumen von ca. 0,3 ml aufwiesen.

Dadurch war das Volumen der einzelnen Ansätze automatisch nach oben hin limitiert.

Um Raum für weitere Zusätze zu lassen, wurden die Lymphozyten bei einem Volumen von 0,2 ml pro Loch suspendiert.

Die zur PHA - Stimulation vorgesehenen Kulturen erhielten einen Zusatz der gewünschten PHA - Konzentration in einem vorgegebenen Volumen von 10 Mikrolitern; die übrigen als Kontrollen gedachten Ansätze bekamen zur Einstellung auf ein gleich großes Volumen aller Kulturen 10 Mikroliter RPMI 1640 - Gemisch.

PHA selbst war als Highly Purified Phytohaemagglutinin von Wellcome Research Laboratories als Trockensubstanz von 2 mg pro Ampulle bezogen worden (lot K8869, ab Versuch 21 : lot K8463).

Die Auflösung erfolgte zunächst mit 2 ml Aqua dest. pro injectione. Die weitere Einstellung auf die jeweils erforderlichen Konzentrationen an PHA wurde durch Verdünnung mit RPMI 1640 vorgenommen.

Die Ausgangskonzentration betrug also 2 mg / 2 ml, entsprechend 10 ug / 10 ul .

An PHA - Konzentrationen wurden angelegt:

0,01 ug / 10 ul , 0,05 ug / 10 ul , 0,1 ug / 10 ul ,
0,5 ug / 10 ul , 1 ug / 10 ul , 10 ug / 10 ul .

Verdünnungsschema:

2 mg PHA + 2 ml Aqua dest. = 2 ml, entsprechend 10 ug / 10 ul .

1 ml der obigen Konzentration + 9 ml RPMI (1 : 10)
ergaben 10 ml, entsprechend 1 ug / 10 ul .

1 ml (1 ug / 10 ul) + 1 ml RPMI (1 : 2)
ergaben 2 ml, entsprechend 0,5 ug / 10 ul .

1 ml (1 ug / 10 ul) + 9 ml RPMI (1 : 10)
ergaben 10 ml, entsprechend 0,1 ug / 10 ul .

1 ml (0,1 ug / 10 ul) + 1 ml RPMI (1 : 2)
ergaben 2 ml, entsprechend 0,05 ug / 10 ul .

1 ml (0,1 ug / 10 ul) + 9 ml RPMI (1 : 10)
ergaben 10 ml, entsprechend 0,01 ug / 10 ul .

Die hergestellten Konzentrationen wurden jeweils bei einem Volumen von 0,5 ml auf Falcon - Plastic - Tubes (Nr. 2003) verteilt und bis zur Verwendung bei minus 40 Grad Celsius eingefroren.

Die mit Lymphozytensuspensionen und PHA fertig präparierten Kulturplatten wurden durch einen sterilen Klebestreifen (Falcon - Plastics, Nr. 3044) und eine Deckplatte (Falcon - Plastics, Nr. 3041) verschlossen.

Für unterschiedliche Zeiträume von 48, 72 und 96 Stunden schloß sich die Inkubation bei 37 Grad Celsius teils unter 5 %-iger CO₂ - Begasung, teils unter Normalatmosphäre an. 3, 4 oder 5 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit erhielten sämtliche Kulturen 10 Mikroliter einer ³H - Thymidin enthaltenden Lösung.

(methyl - ³H) Thymidine (Tra. 120 , Batch 120) wurde bezogen aus dem Radiochemical Centre, Amersham / England. Mit RPMI 1640 wurden Konzentrationen von 0,5 , 1 und 2 uCi / 10 ul eingestellt. (Verdünnungsverfahren, ähnlich der Verdünnung von PHA)

Nach Abschluß der Inkubation ermöglichte eine spezielle Absaugvorrichtung (MASH II), ähnlich der von H a r t z m a n et al (17) angegebenen Apparatur (Hiller, Madison, Wisconsin / USA) , in einem Arbeitsgang bis zu 24 der in den Vertiefungen der Kulturplatte liegenden Ansätze gleichzeitig anzusaugen und auf einen Glasfiberfilterstreifen (934 AH Reeve Angel, Dynatech, Nürtingen) zu filtrieren. Hierdurch erfolgte die Trennung der Lymphozyten von dem mit ³H - Thymidin angereicherten Medium. Die Inkorporation der markierten Pyrimidinbase in die DNA der Lymphozyten kam zum Erliegen.

Durch zwanzigmaliges Spülen der Löcher in den Kulturplatten mit gefiltertem Aqua dest. wurde ein Haftenbleiben der

Lymphozyten an der Plattenwandung so gering wie möglich gehalten. Die den Glasfiberstreifen nicht passierenden Lymphozyten sammelten sich auf ihm in 24 Regionen an, die jeweils einer Kultur entsprachen.

Nach eintägiger Trocknung an der Luft zeichneten sich auf dem Glasfiberstreifen kreisrunde Flächen ab, jeweils einer Kultur entsprechend.

Diese deutlich abgegrenzten Bezirke ließen sich leicht mit einer Pinzette aus dem Filterstreifen in toto herauslösen und in verschließbare Szintillationsgefäße (Fa. Zinsser) geben, die mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt waren.

Die Filtrate wurden in der Szintillationsflüssigkeit gelöst. Um eine Schichtenbildung innerhalb der Szintillationsgefäße zu vermeiden, wurden sie für ein paar Sekunden kräftig gerüttelt.

Die Szintillationsflüssigkeit selbst wurde in der Universitäts - Hautklinik Münster im großen angesetzt und bestand aus

54,8 g PPO (2,5 - Diphenyloxazol; M = 221;
Fluoreszenz max. 3800 Å; Fa. Werner Zinsser)
4,56 l Triton X - 100
und 9,12 l Toluol .

Zur Zählung kamen die Szintillationsgefäße in das Packard Tri - Carb Spectrometer Modell 3380 der Hautklinik. Als ausreichend genau wurde eine Zähldauer von 2 Minuten pro Probe angesehen.

Sämtliche Ergebnisse wurden automatisch vom Computer auf einem Datenblatt in CPM (counts per minute) zusammengestellt.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Statistische Berechnungen

Grundlage unserer in Tabellen und Abbildungen wiedergegebenen Versuchsergebnisse sind statistische Berechnungen von Vielfachbestimmungen. Die Anzahl der identisch angesetzten Proben, die in den Tabellen jeweils angegeben wird, betrug mindestens 3, höchstens 6.

In den Tabellen (mit Ausnahme der Tabellen 1 und 2) stehen als Ergebnis jeweils 3 Werte untereinander. Dabei entsprechen diese Zahlen von oben nach unten gelesen :

- 1) dem Mittelwert (M)
- 2) der Standardabweichung (s)
- 3) dem Variationskoeffizienten (V) in %

Wir legten folgende Formeln für die statistische Auswertung zugrunde:

I. Durchschnitt M = Mittelwert oder $\bar{x}$

$$M = \frac{\sum x}{n}$$

II. Streuung

$$s^2 = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$$

III. Standardabweichung

$$s = \sqrt{s^2}$$

IV. Variationskoeffizient

$$V = \frac{s}{n - 1} \cdot 100$$

V. Standardabweichung des Mittelwertes

$$s_M = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

VI. Standardabweichung der Mittelwertdifferenz

$$s_{\text{diff}} = \frac{\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n_1} + \sum x_2^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n_2}}{n_1 + n_2 - 2} \times \frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2}$$

VII. Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte

$$t_{\text{diff}} = \frac{M_1 - M_2}{s_{\text{diff}}}$$

3.4.2. Lymphozytenseparationstechnik

Die Lymphozytengewinnung nach der Methode von Bö y u n (2) unter Verwendung einer normalen Zentrifuge bei Zimmertemperatur lieferte durchweg ausreichende Ernteergebnisse. So konnten durchschnittlich 50 bis 75 Prozent der im Vollblut vorhandenen Lymphozyten nach dem zweiten Waschgang gewonnen werden.

Die Cytocentrifugenpräparate wiesen um 90 bis 95 Prozent Lymphozyten aus. Bei den restlichen Prozentwerten handelte es sich oft um zerstörte, morphologisch schwer einzuordnende Zellstrukturen.

Tabelle 1 gibt anhand des Versuches 29 ein Beispiel über das Ausmaß des Zellverlustes (durchschnittlich hier 60 Prozent der ursprünglichen Lymphozyten geerntet, Standardabweichung 14, Variationskoeffizient 23 (%)).

3.4.3. Zellabsterberate während der Versuchsdurchführung

Tabelle 2 gibt die Anzahl der nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden abgestorbenen Lymphozyten wieder.

Die Ermittlung der untergegangenen Zellen erfolgte durch Auszählung nach vorheriger Anfärbung mit 0,5 %-iger Trypan - blue - Lösung.

Die Inkubation fand hierbei unter Normalatmosphäre (Versuch 29) statt.

TABELLE 1

Zellverlust durch Lymphozytenseparationstechnik

Beispiel : Versuch Nr. 29

Ausgangswerte:

In 10 ml Blut enthaltene			
	Leukozyten,	davon Lymphozyten	
		(in Prozent)	(absolut)
G.F.	8 x 10 ⁷	61 %	4,9 x 10 ⁷
M.S.	7,6 x 10 ⁷	50 %	3,8 x 10 ⁷
S.Y.	4,2 x 10 ⁷	44 %	1,8 x 10 ⁷
D.B.	5 x 10 ⁷	44 %	2,2 x 10 ⁷
D.D.	5,2 x 10 ⁷	52 %	2,7 x 10 ⁷
U.K.	4,4 x 10 ⁷	42 %	1,8 x 10 ⁷
D.P.	3,4 x 10 ⁷	50 %	1,7 x 10 ⁷
D.K.	8,8 x 10 ⁷	38 %	3,3 x 10 ⁷

Endwerte (nach dem 2. Waschgang):

	Leukozyten,	davon Lymphozyten	
		(in Prozent)	(absolu)
G.F.	3,1 x 10 ⁷	97 %	3 x 10 ⁷
M.S.	2,3 x 10 ⁷	92 %	2,1 x 10 ⁷
S.Y.	1,9 x 10 ⁷	85 %	1,6 x 10 ⁷
D.B.	1 x 10 ⁷	90 %	9 x 10 ⁶
D.D.	1,8 x 10 ⁷	95 %	1,7 x 10 ⁷
U.K.	9,8 x 10 ⁶	89 %	8,7 x 10 ⁶
D.P.	1,1 x 10 ⁷	94 %	1 x 10 ⁷
D.K.	2,2 x 10 ⁷	93 %	2 x 10 ⁷

Prozentsatz der gewonnenen Lymphozyten im Vergleich zu den im Vollblut vorhandenen :

G.F.	61 %	D.D.	63 %
M.S.	55 %	U.K.	48 %
S.Y.	89 %	D.P.	59 %
D.B.	41 %	D.K.	61 %

TABELLE 2

Ermittlung der während der Versuchsdurchführung

abgestorbenen Zellen

Beispiel: Versuch 29

Mischung der Zellsuspensionen mit 0,5 %-iger
Trypan - blue - Lösung, Auszählung nach 10 Minuten

Rate der abgestorbenen Lymphozyten :
nach 1 Stunde nach 72 Stunden

G.F.	4 %	7 %
M.S.	0 %	8 %
S.Y.	0 %	15 %
D.B.	0 %	4 %
D.D.	2 %	9 %
U.K.	4 %	14 %
D.P.	4 %	4 %
D.K.	4 %	21 %

3.4.4. Bestimmung der Lymphozytenanzahl pro Kultur
(s. Abb. 1 - 4, Tab. 3 - 6)

Die Abhängigkeit der Stimulationsrate von der Lymphozytenzahl pro Kulturansatz (0,2 ml) geben die Abbildungen 1 bis 4 wieder.

Unter Kulturbedingungen bei Normalatmosphäre zeigt sich in Abbildung 1 bei drei von vier Versuchspersonen eine abnehmende Stimulationsrate bei höheren Lymphozytenkonzentrationen (Bereich : 100.000 - 300.000 Zellen).

Bei einem Probanden (U.K., Abb. 1b) ergibt sich ein Maximum bei 200.000 .

Abbildung 2 (Bereich : 50.000 bis 200.000 Zellen) läßt bei allen untersuchten Personen eine höhere Einbaurate bei steigender Zellzahl erkennen.

In den Abbildungen 3 und 4 kommt es bei neun von elf Personen zu einem deutlichen Anstieg des ^3H - Thymidineinbaus bis zu einer Zellkonzentration von 200.000 (Bereich : 50.000 bis 200.000 Zellen). Bei höheren Konzentrationen ist keine signifikante Erhöhung der Einbaurate mehr feststellbar, vielmehr erfolgt bei sechs dieser neun Personen sogar ein Rückgang der Stimulationsrate.

Daher entschieden wir uns bei der Festlegung der Lymphozytenkonzentration auf einen Wert von 200.000 Zellen pro Kulturansatz.

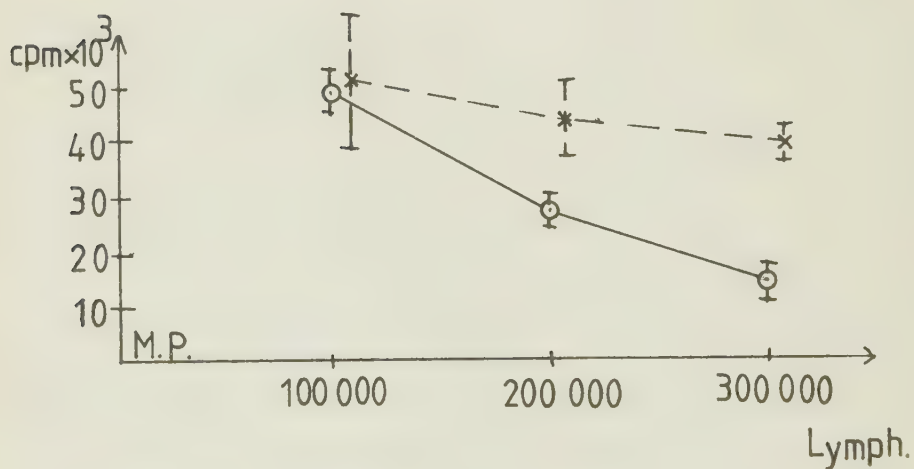
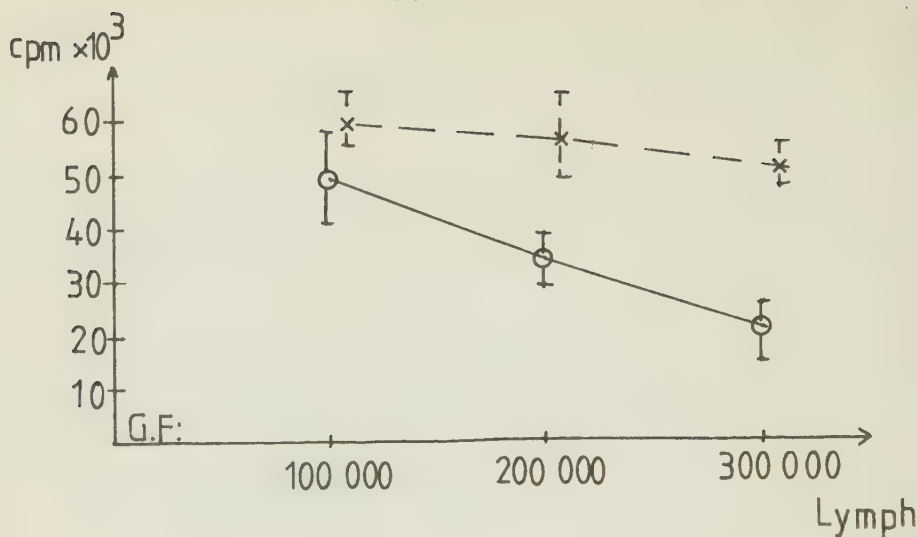


ABBILDUNG 1a

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ³H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Lymphozytenkonzentration

1) in Normalatmosphäre (x - x)

2) in 5 %-iger CO₂ - Atmosphäre (o - o)

(Versuch Nr. 21)

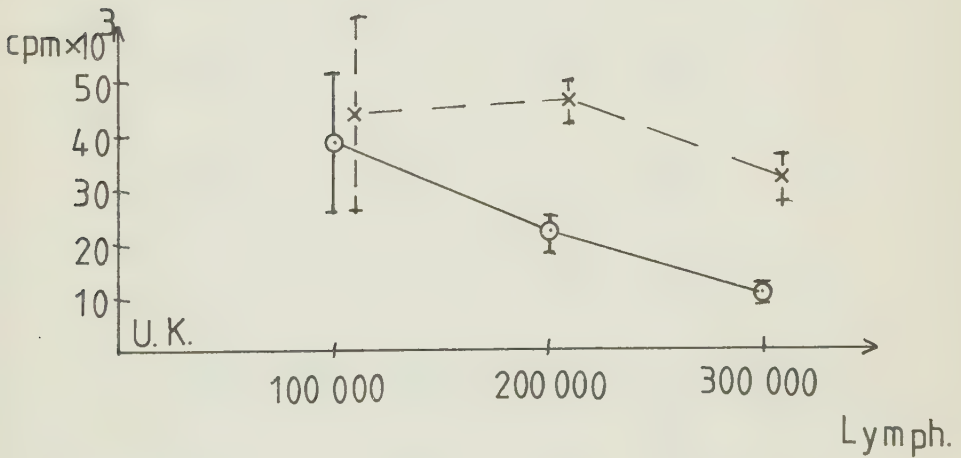
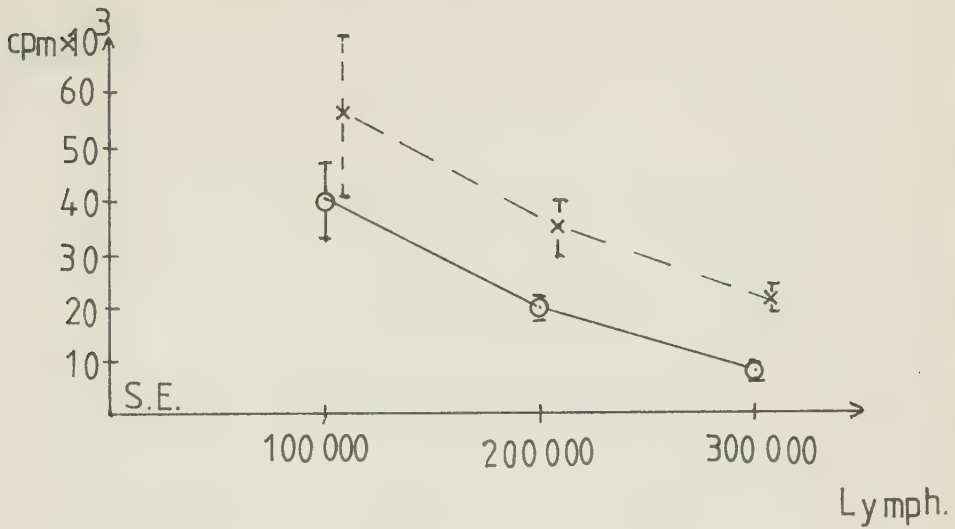


ABBILDUNG 1b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ³H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Lymphozytenkonzentration

1) in Normalatmosphäre (x---x)

2) in 5 %-iger CO₂ - Atmosphäre (o---o)

(Versuch Nr. 21)

TABELLE 3

Versuch Nr. 21 (Mittelwerte aus je 6 Meßwerten)

Ziel : optimale Lymphozytenkonzentration
mit 5% CO₂ / ohne CO₂ (normale Luftzusammensetzung)

vorgegeben : 0,1 ug PHA, Inkubation 72 h,
1 uCi ³H - Thymidin nach 68 h

		Lymphozyten pro Kultur			Kontrollen (ohne PHA)
		100.000	200.000	300.000	
G.F.					
mit 5%					
CO ₂		49.356	34.088	21.076	zwischen
		9.370	5.091	5.277	360
		19%	15%	25%	und 720
ohne		60.256	57.085	51.003	zwischen
CO ₂		4.753	8.476	4.451	300
		8%	15%	9%	und 800
M.P.					
mit 5%					
CO ₂		50.469	28.740	15.112	zwischen
		3.624	2.931	2.957	200
		7%	10%	20%	und 400
ohne		52.255	45.443	39.808	zwischen
CO ₂		12.104	6.753	2.731	400
		23%	15%	7%	und 1500
S.E.					
mit 5%					
CO ₂		39.790	19.945	8.295	zwischen
		7.516	1.876	926	140
		19%	9%	11%	und 300
ohne		55.791	35.426	21.524	zwischen
CO ₂		15.461	5.034	1.765	200
		28%	14%	8%	und 310
U.K.					
mit 5%					
CO ₂		39.200	22.093	10.328	zwischen
		13.056	2.959	2.387	100
		33%	13%	23%	und 530
ohne		44.119	46.175	31.956	zwischen
CO ₂		18.359	3.586	4.305	0
		42%	8%	13%	und 100

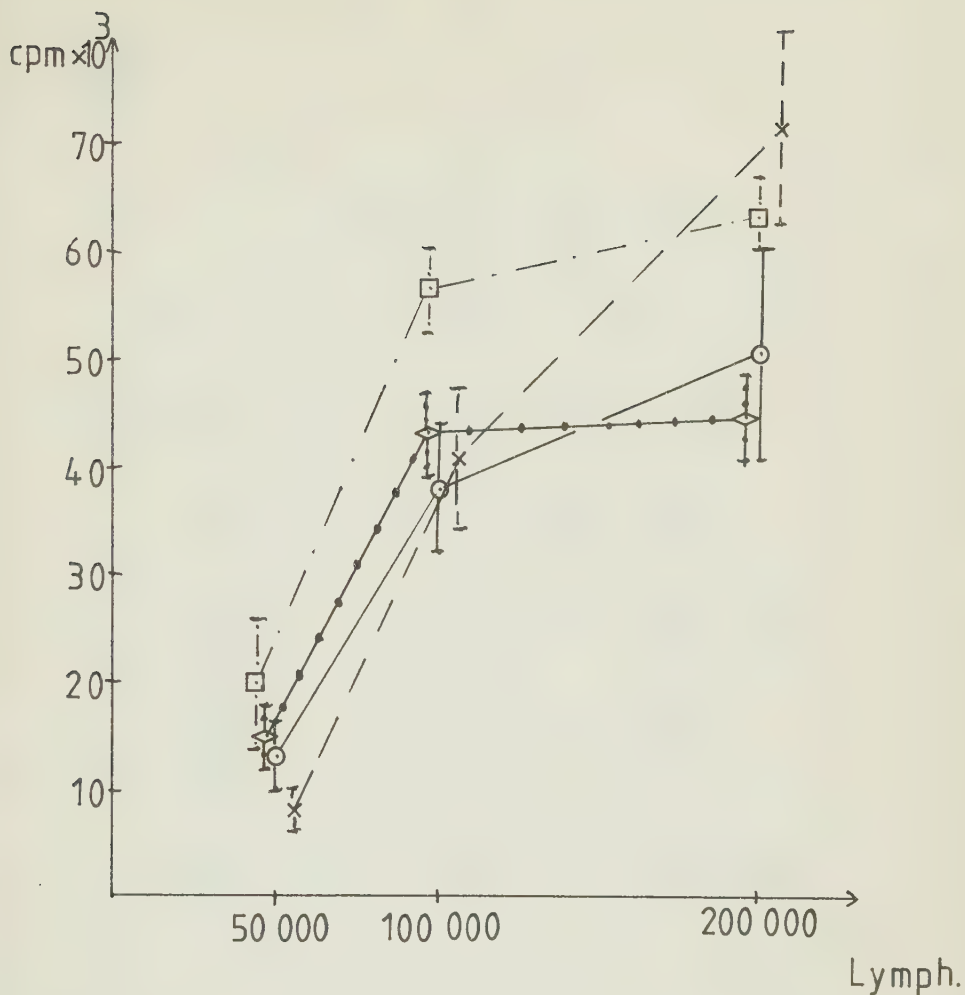


ABBILDUNG 2

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H -Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Lymphozytenkonzentration

D.B. (○—○), M.P. (◇—◇), G.F. (×—×), U.K. (□—□)

(Versuch Nr. 24)

TABELLE 4

Versuch Nr. 24 (Mittelwerte aus je 6 Meßwerten)

Ziel : optimale Lymphozytenkonzentration

vorgegeben : 0,1 ug PHA, 72 h Inkubation,
1 uCi ^3H - Thymidin 4 h vor Versuchsende

	Lymphozyten pro Kultur			Kontrolle (ohne PHA) (200.000)
	50.000	100.000	200.000	
D.B.	13.116 3.399 26%	38.483 6.231 16%	51.320 9.604 19%	304 36 12%
M.P.	15.108 3.218 21%	43.151 3.572 8%	44.940 4.013 9%	393 54 14%
G.F.	7.902 2.160 27%	40.825 6.716 16%	71.740 9.224 13%	950 29 3%
U.K.	20.195 5.825 29%	56.763 4.063 7%	63.849 3.529 6%	363 141 39%

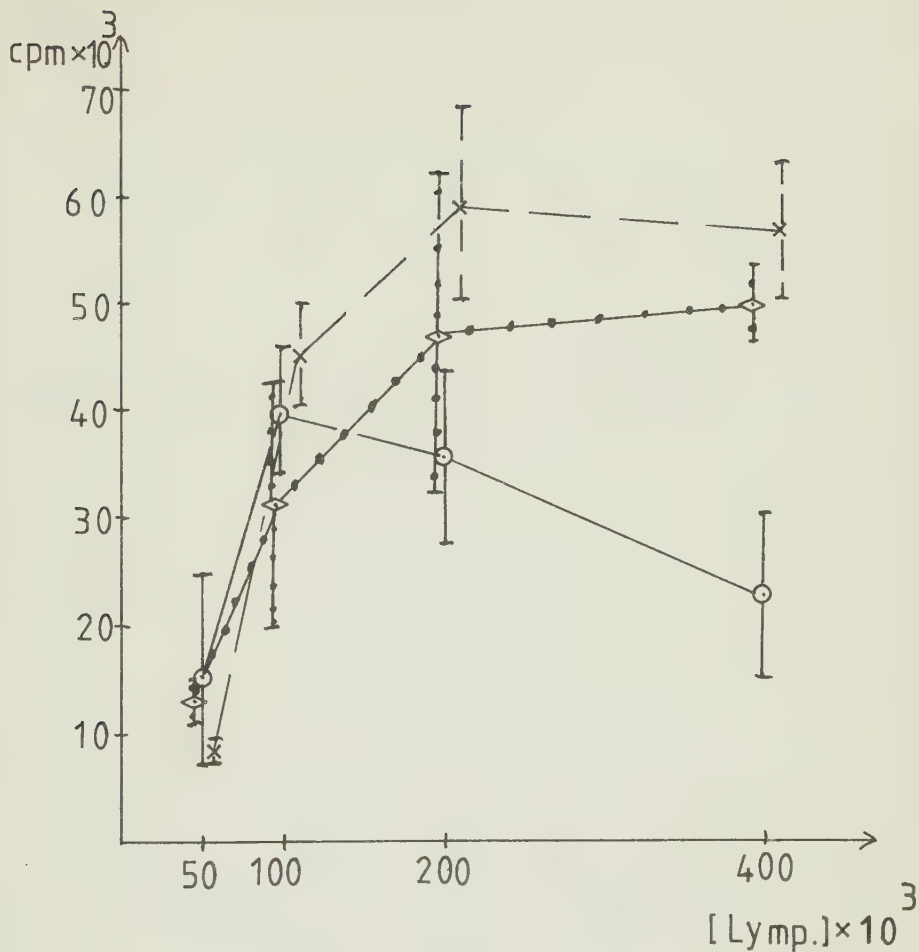


ABBILDUNG 3

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der ^3H - Thymidininkorporation in Abhängigkeit von der Lymphozytenzahl bei einer PHA - Konzentration von 0,1 μg

S.H. ($\bigcirc$ — $\bigcirc$), D.P. ($\bullet$ — $\bullet$), D.V. ($\times$ — $\times$)

(Versuch Nr. 26)

TABELLE 5

Versuch Nr. 26 (Mittelwerte aus je 4 Meßwerten)

Ziel : optimale Lymphozyten - und PHA - Konzentrationen

vorgegeben : Inkubationsdauer 72 h, Zugabe von

1 uCi ^3H - Thymidin nach 68 h

	Anzahl von Lymphozyten	PHA - Konzentration			(ug)	Kontrolle
		0,01	0,05	0,1	1	
S.H.	50.000	93	4.597	16.194	38.691	
		8	3.055	9.223	11.301	
		9%	67%	57%	29%	
	100.000	247	8.625	40.192	49.434	
		4	3.133	5.972	627	
		2%	36%	15%	1%	
	200.000	421	5.109	35.845	26.502	168
		120	1.175	8.211	22.767	3
		29%	23%	23%	86%	2%
	400.000		897	22.867		
			179	7.316		
			20%	32%		
D.P.	50.000	250	4.788	12.843	32.488	
			1.309	1.830	2.021	
			27%	14%	6%	
	100.000	495	17.559	32.227	46.693	
		14	4.185	11.712	1.991	
		3%	24%	36%	4%	
	200.000	1.398	32.822	47.569	27.332	558
			11.682	14.869	6.834	54
			36%	31%	25%	10%
	400.000		17.555	50.444		
			5.064	3.258		
			29%	6%		
D.V.	50.000	192	4.703	8.569	25.443	
		4	1.227	757	4.477	
		2%	26%	9%	18%	
	100.000	368	20.218	45.609	28.405	
		33	3.527	4.495	1.804	
		9%	17%	10%	6%	
	200.000	411	33.626	59.406	33.428	337
		42	4.830	9.069	1.491	9
		10%	14%	15%	5%	3%
	400.000		11.852	57.852		
			6.271	6.082		
			53%	11%		

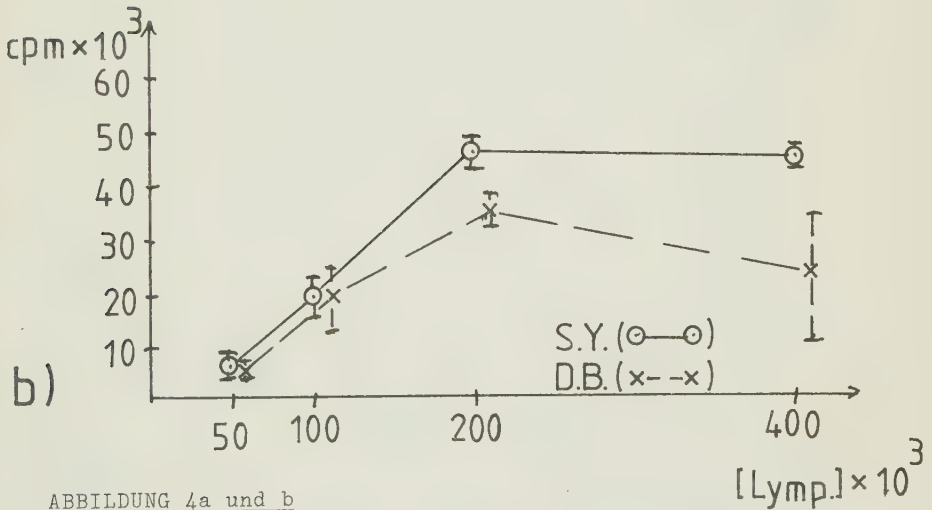
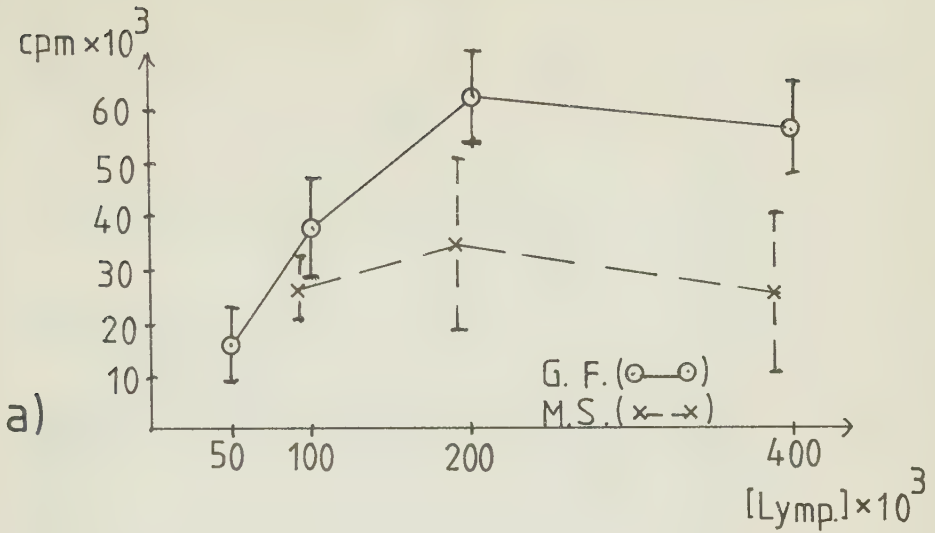


ABBILDUNG 4a und b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Lymphozytenzahl bei einer PHA - Konzentration von 0,1 μg

(Versuch Nr. 29)

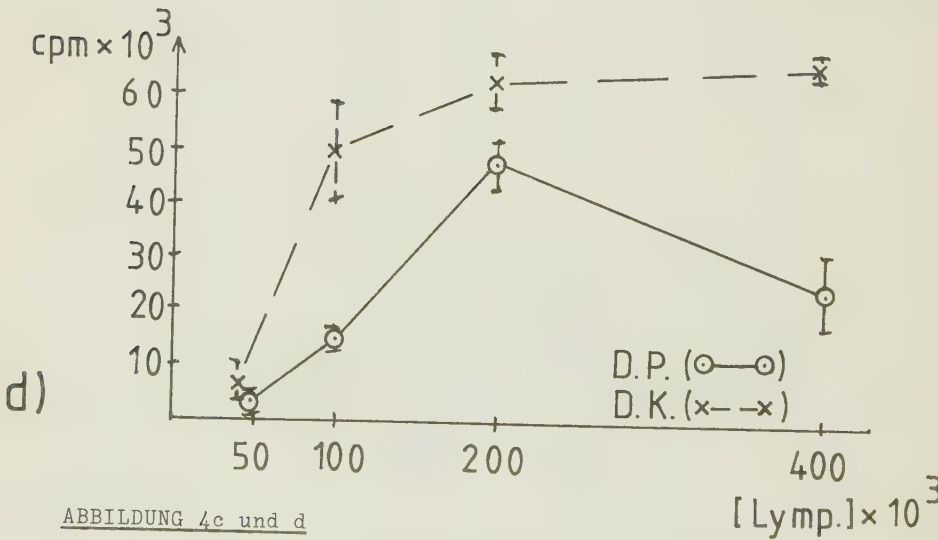
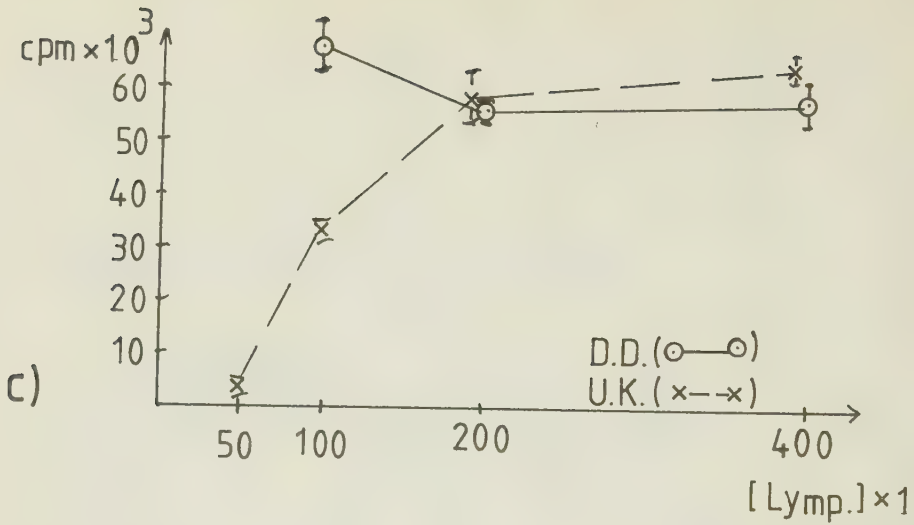


ABBILDUNG 4c und d

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Lymphozytenzahl bei einer PHA - Konzentration von $0,1 \mu\text{g}$

(Versuch Nr. 29)

TABELLE 6

Versuch Nr. 29 (Mittelwerte aus je 3 Meßwerten)

Zielsetzung : optimale Lymphozyten - und PHA - Konzentrationen
vorgegeben : Inkubationsdauer 72 h, Zugabe von
1 uCi ^3H - Thymidin nach 68 h

Lympho- zytenzahl	0,01	PHA - Konzentrationen (ug)				0
	0,05	0,1	0,5	1		
G.F.						
50.000	146 1 1%	2.523 426 17%	16.383 7.443 45%	12.794 9.388 73%	4.948 786 16%	
100.000	3.037 1.290 43%	11.576 4.019 35%	38.116 9.419 25%	40.142 8.613 22%	35.799 4.728 13%	
200.000	19.217 2.735 14%	55.102 2.885 5%	63.337 7.885 12%	57.801 1.827 3%	38.052 1.483 4%	627 117 19%
400.000		54.058 5.368 10%	57.697 7.882 14%	42.255 448 1%		
M.S.						
100.000	415 21 5%	9.903 3.604 36%	26.857 5.666 21%	37.099 6.348 17%	41.450 2.700 7%	
200.000	699 175 25%	15.063 10.160 67%	34.265 16.772 49%	47.447 3.341 7%	46.133 296 1%	337 51 15%
400.000		9.333 5.845 63%	25.877 14.763 57%	37.300 3.101 8%		
S.Y.						
50.000	278 4 1%	3.170 879 28%	6.035 1.617 27%	22.608 1.297 6%	21.975 297 1%	
100.000	1.694 502 30%	34.790 2.158 6%	18.652 3.718 20%	46.168 4.714 10%	42.101 6.859 16%	
200.000	3.023 46 2%	26.599 922 3%	45.560 2.864 6%	46.379 2.341 5%	42.184 2.160 5%	208 32 15%
400.000		12.773 7.361 58%	45.113 2.352 5%	501 46 9%		

TABELLE 6 (Fortsetzung 1)

Lympho- zytenzahl	0,01	PHA - Konzentrationen ² (ug)				0
		0,05	0,1	0,5	1	
D.B.						
50.000	45	4.272	6.145	25.261	22.430	
	18	1.495	1.314	1.467	2.010	
	41%	35%	21%	6%	9%	
100.000	619	14.660	18.528	44.562	39.369	
	389	2.132	6.405	8.188	4.056	
	63%	15%	35%	18%	10%	
200.000	2.350	35.659	35.415	39.427	33.316	297
	248	11.657	3.221	560	7.640	58
	11%	33%	9%	1%	23%	20%
400.000		6.199	22.721	469		
		4.241	10.964	102		
		68%	48%	22%		
D.D.						
50.000	356	8.359	8.071	27.754	26.936	
	214	369	1.864	4.312	369	
	60%	4%	23%	16%	1%	
100.000	3.497	45.998	67.592	53.399	52.144	
	1.191	1.549	3.926	3.920	297	
	34%	3%	6%	7%	1%	
200.000	5.128	40.575	56.138	45.356	45.248	301
	878	3.155	829		11.146	33
	17%	8%	1%		25%	11%
400.000		48.959	57.247	42.101		
		19.484	3.928	1.220		
		40%	7%	3%		
U.K.						
50.000	133	2.220	3.065	15.795	17.521	
			1.612	3.673	1.418	
			53%	23%	8%	
100.000	707	10.087	32.754	62.012	62.591	
	142	2.640	692	684	1.349	
	20%	26%	2%	1%	2%	
200.000	2.011	34.793	58.686	44.605	46.315	203
	798	18.538	4.524	2.571	2.153	13
	40%	53%	8%	6%	5%	6%
400.000		40.486	66.337	34.135		
		17.287	1.989	1.301		
		43%	3%	4%		

TABELLE 6 (Fortsetzung 2)

Lympho- zytenzahl	PHA - Konzentrationen (ug)					0
	0,01	0,05	0,1	0,5	1	
D.P.						
50.000	92	2.171	2.779	5.473	5.853	
	11	588	749	4.231	1.310	
	12%	27%	27%	77%	22%	
100.000	265	22.747	14.855	21.107	20.237	
	86	6.471	1.163			
	32%	28%	8%			
200.000	1.628	34.949	48.213	39.520	44.558	442
	40	3.297	3.965	377	6.265	79
	2%	9%	8%	1%	14%	18%
400.000		15.962	24.870	6.000		
		4.298	6.493	803		
		27%	26%	13%		
D.K.						
50.000	374	8.561	6.677	41.245	33.279	
	133	4.559	3.564		1.679	
	36%	53%	53%		5%	
100.000	2.697	38.708	50.064	49.783	52.524	
	378	5.416	9.108	4.652	1.476	
	14%	14%	18%	9%	3%	
200.000	13.496	68.923	63.314	39.230	38.922	300
	1.095	5.941	4.842		7.284	61
	8%	9%	8%		19%	20%
400.000		72.735	67.678	22.388		
		1.625	1.355	3.427		
		2%	2%	15%		

3.4.5. Ermittlung einer optimalen PHA-Konzentration (s. Abb. 5 - 8 und Tab. 5 - 8)

Die günstigste PHA - Dosierung wurde unter Variation der anderen Parameter untersucht. Dies belegen die Tabellen 5, 6, 7 und 8 . In den Abbildungen 5 bis 8 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

In den aufgeführten vier Abbildungen zeigt sich unter insgesamt 25 wiedergegebenen Dosis - Wirkungskurven in 17 Fällen ein deutlicher Anstieg der Stimulationsrate bei steigenden Konzentrationen bis zu 0,1 ug PHA . Bei höheren Konzentrationen kann nur in 1 Fall (Abb. 8a, M.S.) eine deutlich bessere Einbaurate von ^3H - Thymidin festgestellt werden.

In 7 Fällen bleibt die Stimulationsrate bei Dosierungen zwischen 0,05 und 0,1 ug PHA in etwa gleich oder fällt nur geringfügig ab.

Ein signifikanter Abfall bei Erhöhung der Konzentration an PHA von 0,05 auf 0,1 ug ist in nur 1 Fall (Abb. 6d, D.P. - von 69.166 auf 44.259 -) zu verzeichnen.

Es scheint deshalb angemessen, unter unseren Kulturbedingungen eine Dosierung von 0,1 ug PHA als optimale Konzentration anzusehen.

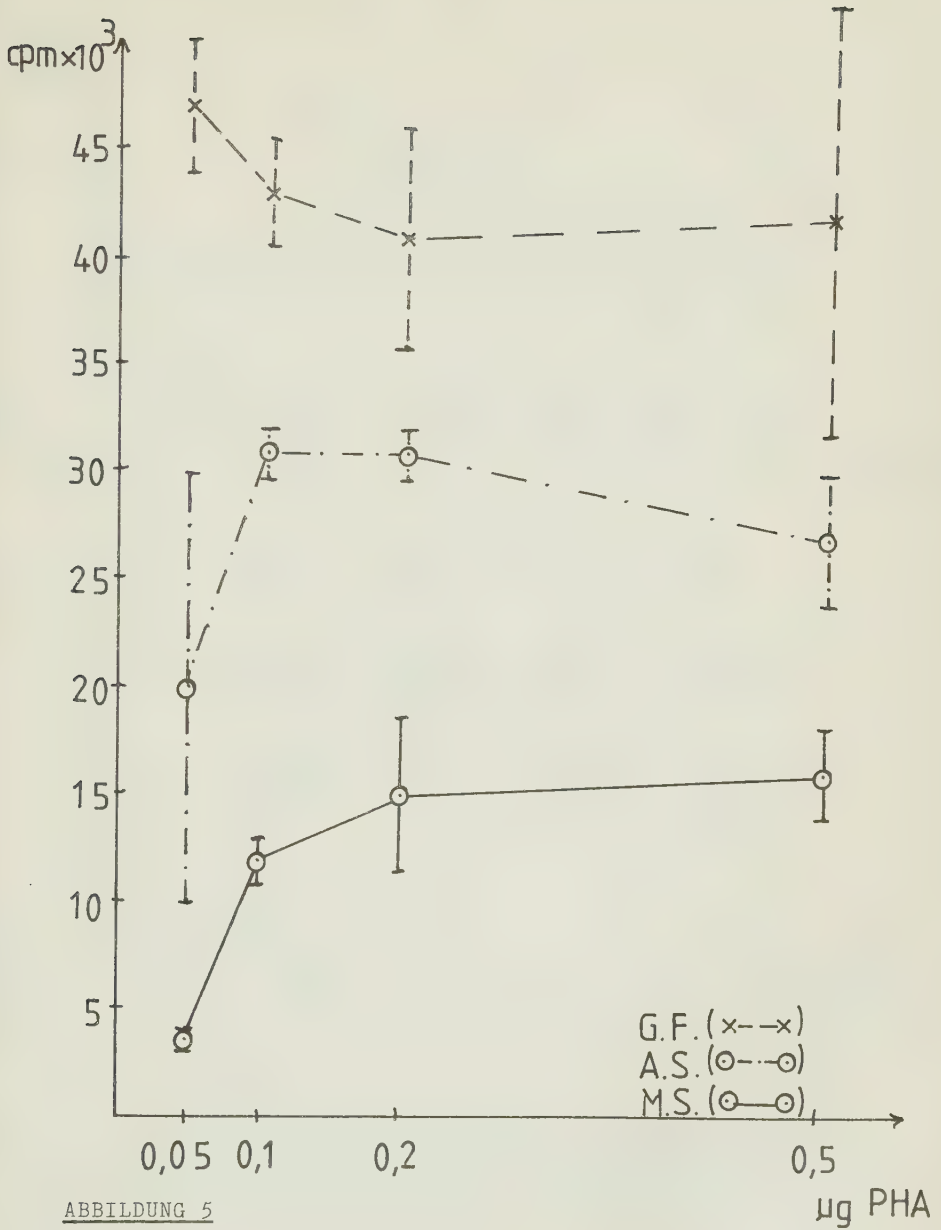


ABBILDUNG 5

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H -Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Konzentration an PHA

TABELLE 7

Versuch Nr. 22 (Mittelwerte aus je 4 Meßwerten)

Ziel : optimale PHA - Konzentration

vorgegeben : 200.000 Lymphozyten, 72 h Inkubation unter
Normalatmosphäre, 1 uCi ^3H - Thymidin nach
68 h

	PHA - Konzentration				
	0,05 ug	0,1 ug	0,2 ug	0,5 ug	0 ug (Kontrolle)
M.S.	3.486 579 17%	11.695 1.245 11%	15.814 3.532 22%	16.351 2.147 13%	367 75 20%
G.F.	47.857 3.075 6%	43.060 2.586 6%	41.398 5.201 13%	42.167 10.856 26%	355 30 8%
A.S.	20.247 10.845 54%	30.904 1.339 4%	30.924 1.393 5%	26.765 3.363 13%	308 40 13%

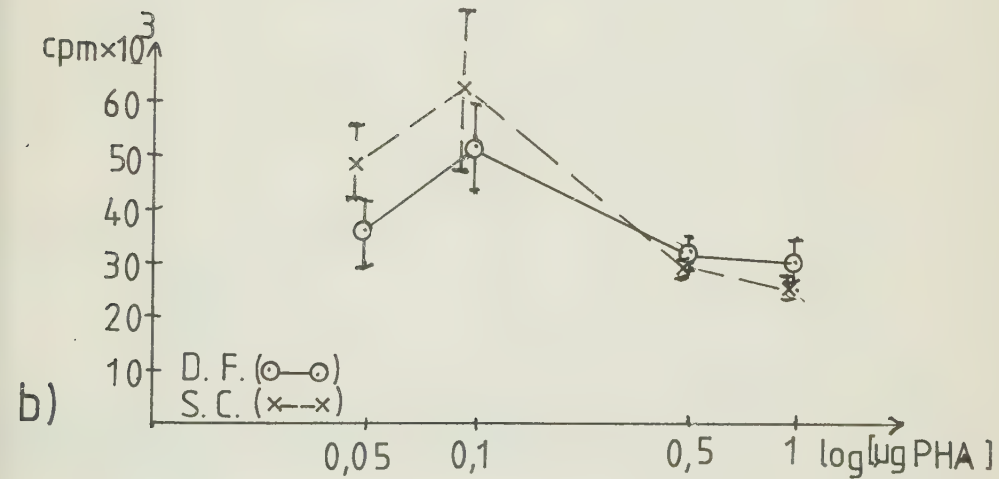
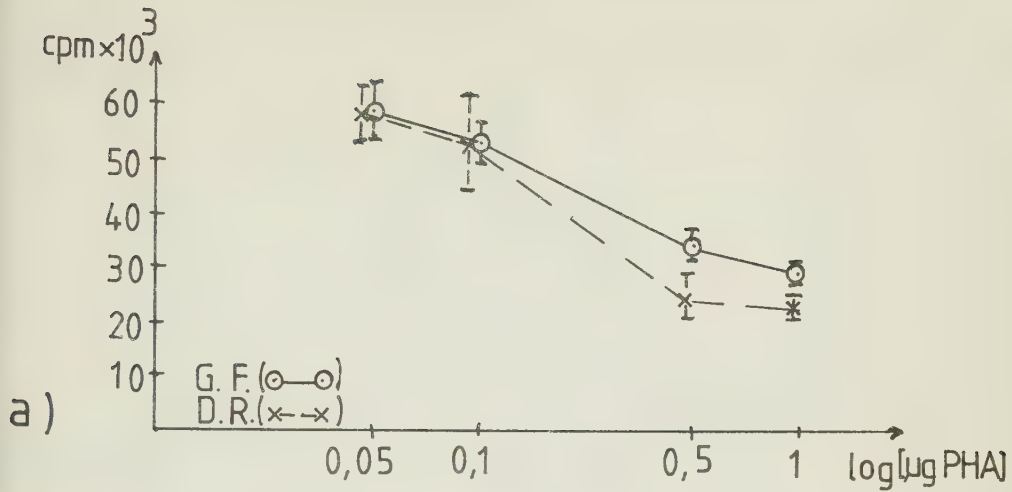


ABBILDUNG 6a und b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenkonzentration von 200.000

(Versuch Nr. 25)

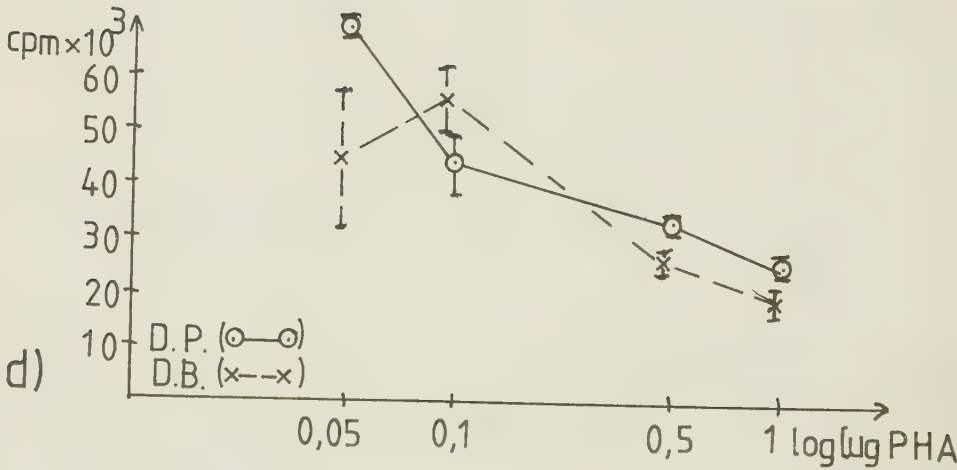
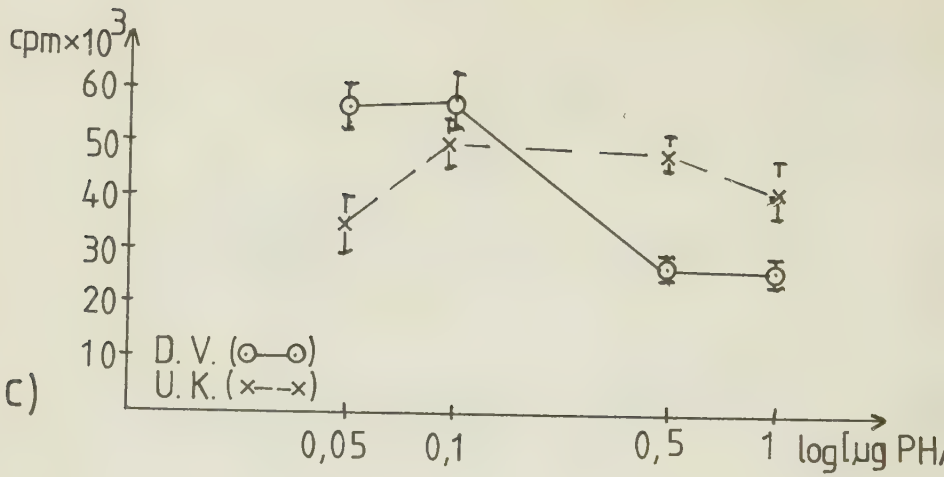


ABBILDUNG 6c und d

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenkonzentration von 200.000

(Versuch Nr. 25)

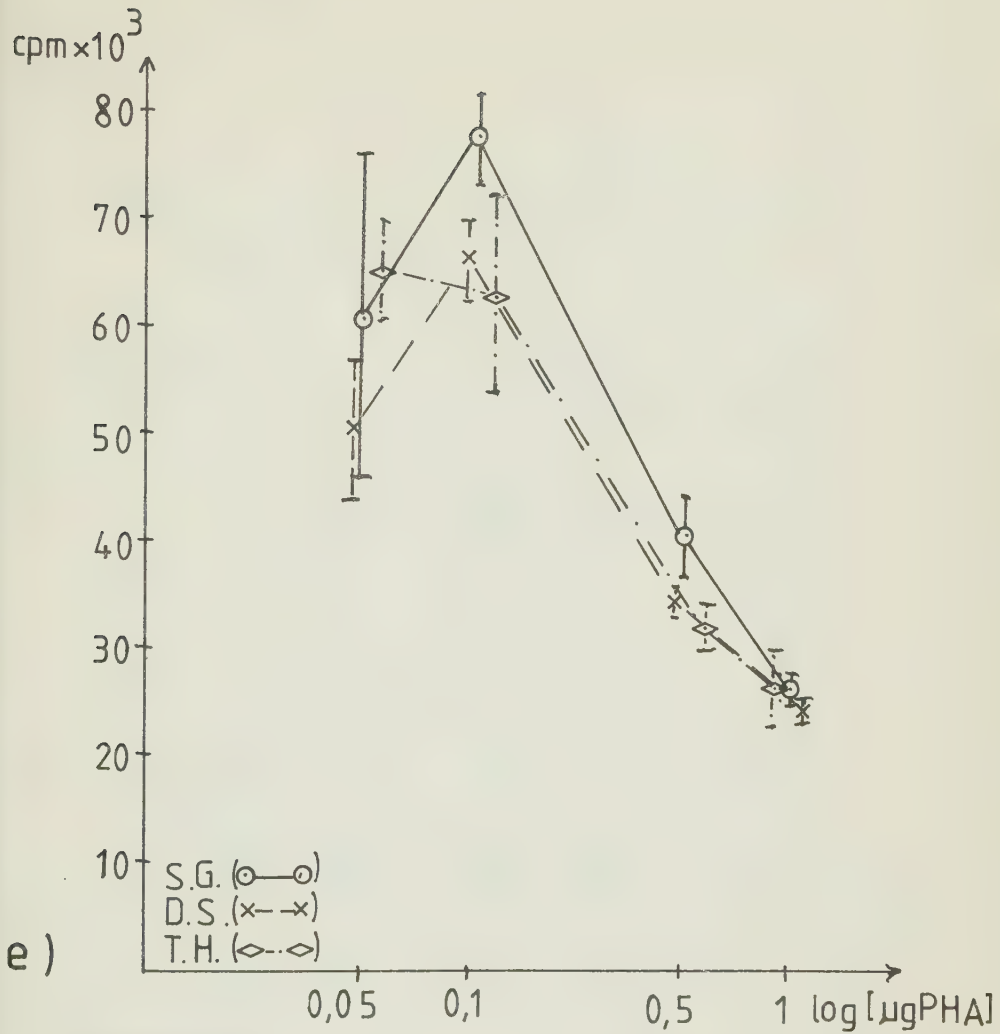


ABBILDUNG 6e

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ³H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenkonzentration von 200.000

(Versuch Nr. 25)

TABELLE 8

Versuch Nr. 25 (Mittelwerte aus je 3 Meßwerten)

Ziel : optimale PHA - Konzentration

vorgegeben : 200.000 Lymphozyten, 72 h Inkubation,
nach 68 h Zugabe von 1 uCi ^3H - Thymidin

	PHA - Konzentration				
	0,05 ug	0,1 ug	0,5 ug	1 ug	0 ug (Kontrolle)
G.F.	59.517 4.691 8%	53.621 3.445 6%	35.424 2.877 8%	30.338 1.753 6%	686 96 14%
D.R.	58.860 4.560 8%	53.464 8.854 17%	26.332 3.927 15%	23.898 2.488 10%	484 21 4%
D.F.	36.246 6.337 17%	51.777 8.340 16%	31.994 2.523 8%	29.763 4.626 16%	327 88 27%
S.C.	49.062 7.140 15%	61.834 14.987 24%	29.521 946 3%	25.929 1.778 7%	514 70 14%
D.V.	56.543 2.668 5%	58.292 4.919 8%	26.709 802 3%	25.556 1.731 7%	581 107 18%
U.K.	34.759 4.852 14%	49.528 5.238 11%	49.453 2.751 6%	42.438 5.420 13%	505 47 9%
D.P.	69.166 637 1%	44.259 4.726 11%	34.330 543 2%	24.852 792 3%	469 51 11%
D.B.	44.537 13.258 30%	56.011 5.973 11%	26.383 1.851 7%	20.910 1.712 8%	335 61 18%
S.G.	60.940 15.241 25%	78.410 4.046 5%	41.266 3.573 9%	35.671 1.747 5%	431 115 27%
T.H.	65.514 4.530 7%	63.325 9.056 14%	32.493 1.924 6%	24.911 2.999 12%	566 24 4%

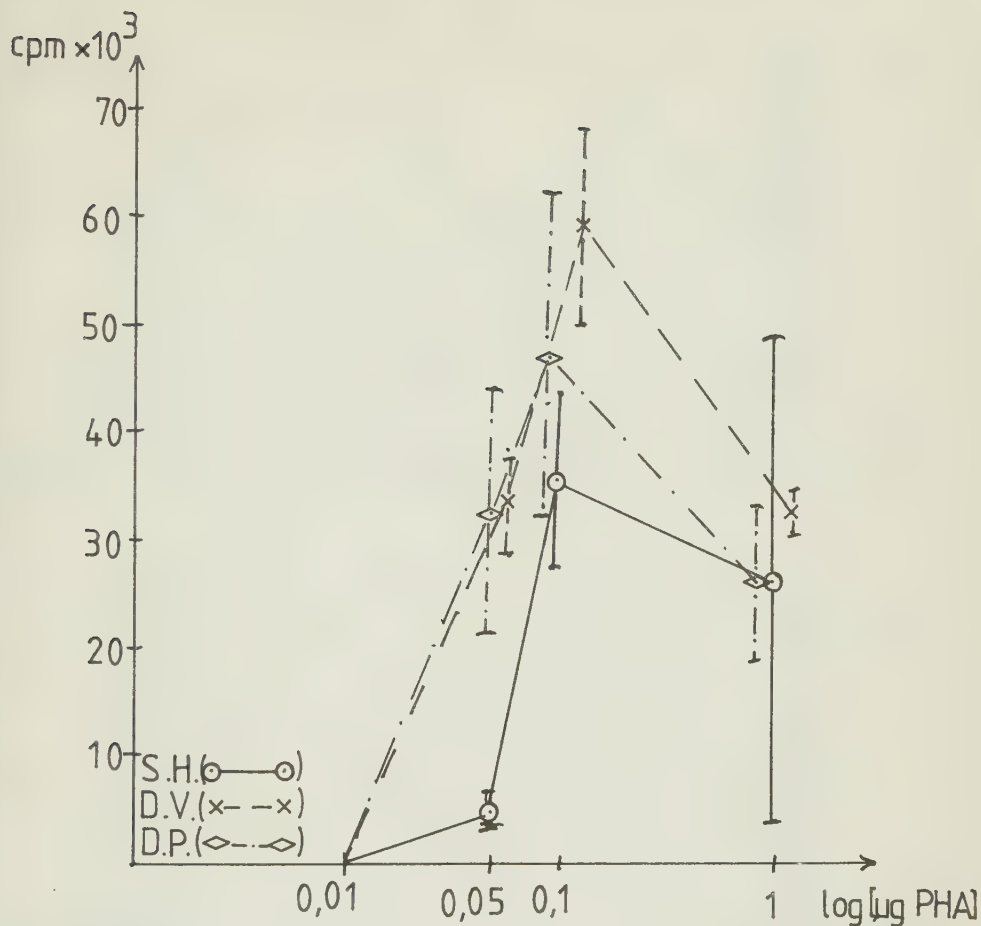


ABBILDUNG 7

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenkonzentration von 200.000

(Versuch Nr. 26)

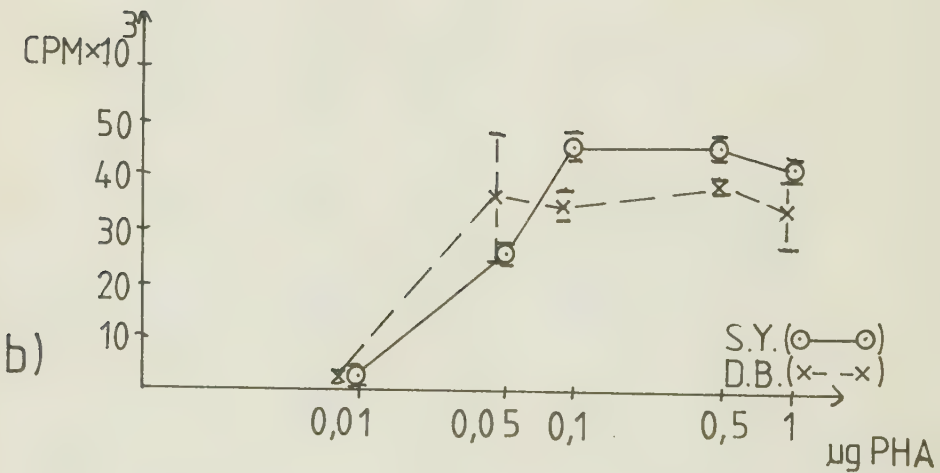
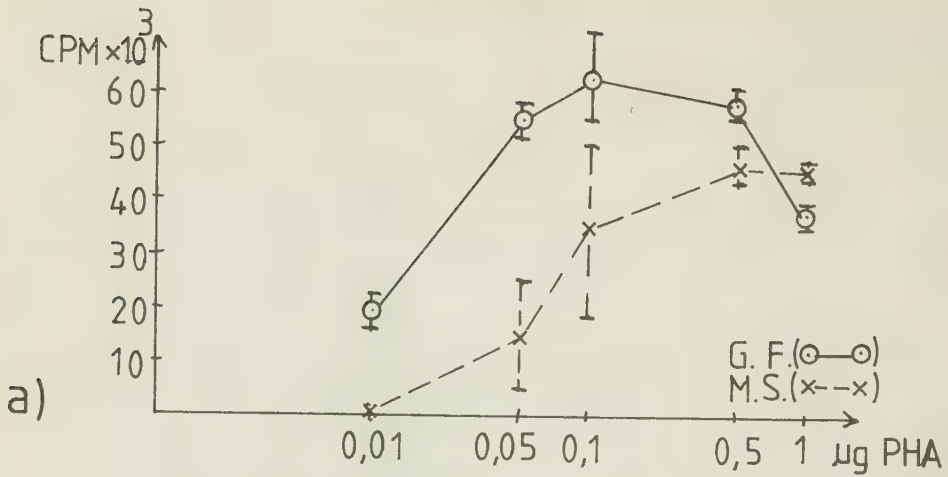


ABBILDUNG 8a und b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenzahl von 200.000

(Versuch Nr. 29)

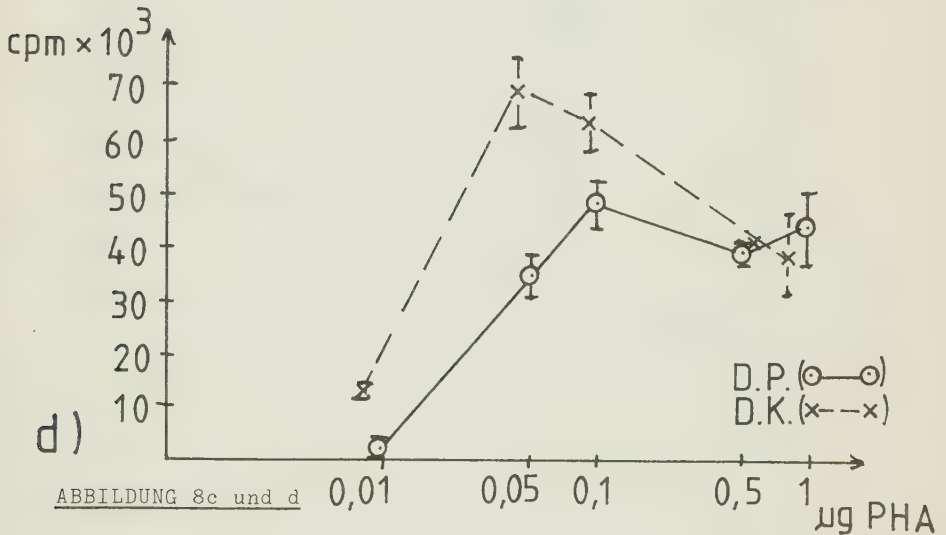
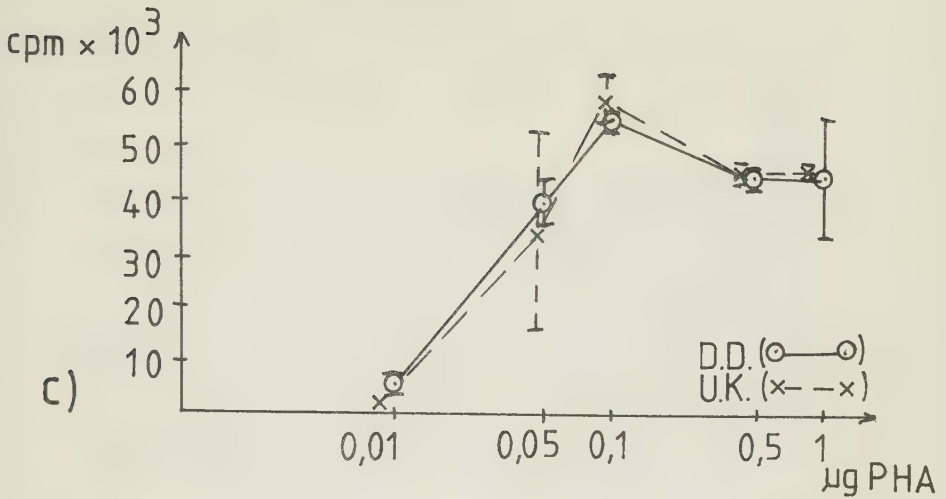


ABBILDUNG 8c und d

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ³H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der PHA - Konzentration bei einer Lymphozytenzahl von 200.000

(Versuch Nr. 29)

3.4.6. Untersuchungen zur Gesamtinkubationsdauer

(s. Abb. 9 + 10 und Tab. 9 + 10)₄

Die Abbildungen 9 und 10 sowie die Tabellen 9 und 10 geben Aufschluß über Untersuchungen zur Gesamtinkubationszeit der Kulturen.

Abbildung 9 stellt anhand des Versuches 23 die Stimulationsraten bei identischen Kulturansätzen nach 48 und 72 Stunden Inkubationszeit dar. Bei allen untersuchten fünf Personen zeigt sich eine eindeutige Erhöhung des ^3H - Thymidineinbaus nach 72 Stunden.

In Abbildung 10 werden die Ergebnisse des Versuchs 30 miteinander verglichen. Nach 48, 72 und 96 Stunden Inkubationszeit findet sich bei sieben von acht untersuchten Personen ein Maximum des ^3H - Thymidineinbaus nach 72 Stunden. Nur bei einer Person stellt sich ein Stimulationsoptimum nach 96 Stunden ein.

Deshalb werden von uns 72 Stunden als optimale Gesamtinkubationszeit gewählt.

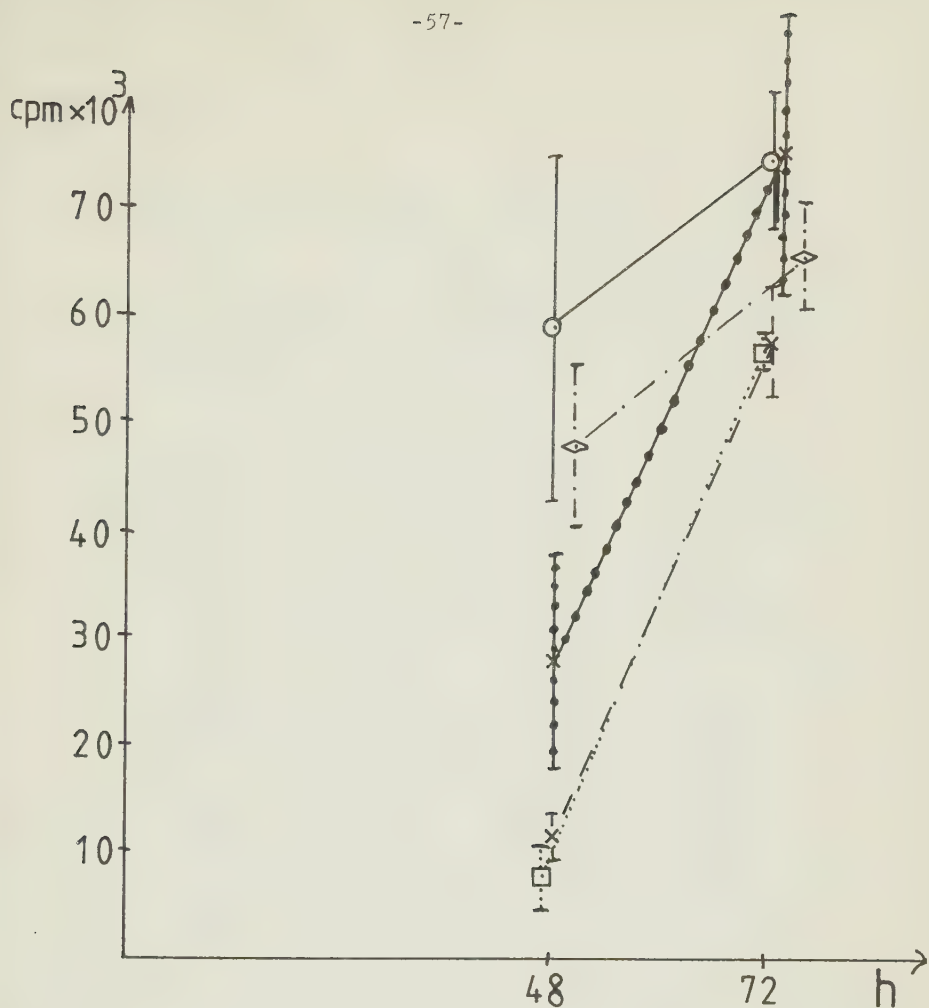


ABBILDUNG 9

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H -Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

S.K. (○—○), A.K. (×—×), C.B. (×—×), G.S. (◇—◇), U.K. (□—□)

(Versuch Nr. 23)

TABELLE 9

Versuch Nr. 23 (Mittelwerte aus je 6 Meßwerten)

Ziel : optimale Inkubationsdauer

vorgegeben : 200.000 Lymphozyten, 0,1 ug PHA,
1 uCi ^3H - Thymidin 4h vor Versuchsende

	nach 48 h	Kontrolle	nach 72 h	Kontrolle
S.K.	58.894 16.021 27%	449 168 37%	75.178 5.910 8%	581 29 5%
A.K.	27.744 10.285 37%	607 122 20%	75.528 12.924 17%	1.184 347 29%
C.B.	11.466 2.270 20%	444 169 38%	58.198 5.220 9%	1.022 353 35%
G.S.	48.023 7.652 16%	397 75 19%	65.987 4.781 7%	714 131 18%
U.K.	7.860 2.811 36%	314 191 61%	56.954 1.464 3%	444 60 14%

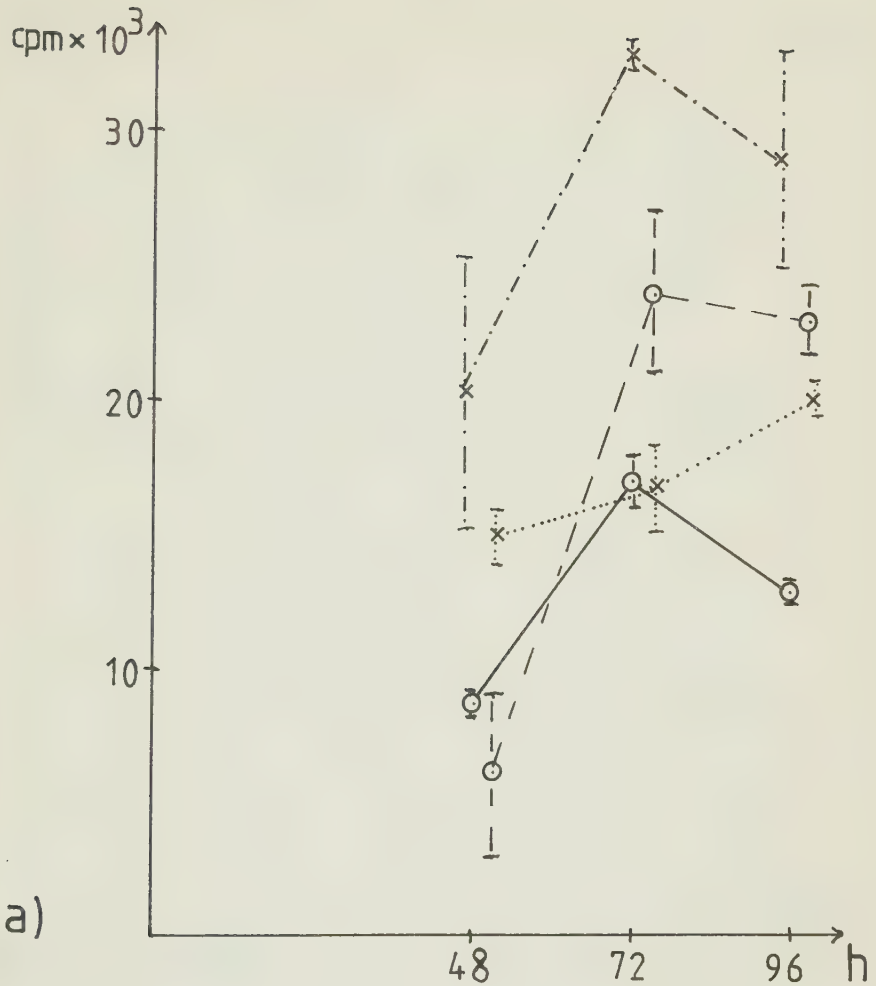


ABBILDUNG 10a

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

M.S. ($\bigcirc$ — $\bigcirc$), D.B. ($\bigcirc$ — $\bigcirc$), D.K. ($\times$ — $\times$), D.N. ($\times$ $\times$)

(Versuch Nr. 30)

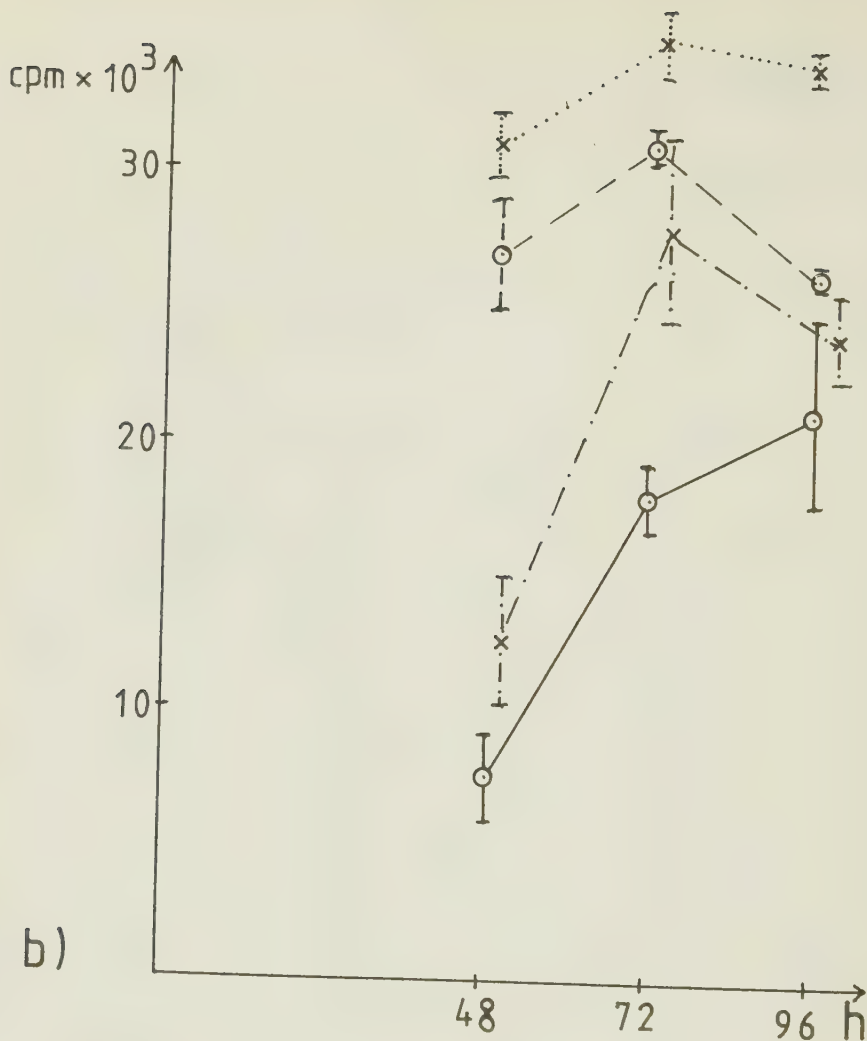


ABBILDUNG 10b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

S.E. (○—○), S.Y. (○—○), S.M. (x—x), G.F. (x.....x)

(Versuch Nr. 30)

TABELLE 10

Versuch Nr. 30 (Mittelwerte aus je 3 Meßwerten)

Zielsetzung : Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit und der Einwirkzeit des ^3H - Thymidins auf die Stimulationsrate

vorgegeben : 0,1 μg PHA, 200.000 Lymphozyten,
1 μCi ^3H - Thymidin

Inkubations- dauer	Dauer der ^3H - Thymidineinwirkung			
	3 h	4 h	5 h	Kontrolle (ohne PHA)
M.S.				
48 h	7.915	8.574	11.539	
	255	463	1.034	
	3%	5%	9%	
72 h	12.693	17.105	20.713	
	217	1.005	710	
	2%	3%	12%	
96 h	10.445	13.043	23.027	80
	611	399	2.759	13
	6%	3%	12%	16%
D.B.				
48 h	8.625	6.106	19.115	66
	5.072	3.243	130	4
	58%	40%	1%	6%
72 h	15.972	27.123	21.675	142
	6.049	2.831	1.720	23
	38%	10%	8%	16%
96 h	19.460	24.313	31.205	150
	1.732	1.100	2.848	1
	9%	5%	9%	1%
D.K.				
48 h	13.718	20.405	30.744	213
	2.269	4.941	4.994	52
	17%	24%	16%	24%
72 h	25.437	33.450	41.424	176
	1.998	410	5.075	18
	7%	1%	12%	10%
96 h	20.293	28.917	37.296	286
	2.895	3.937	3.020	147
	14%	14%	8%	52%

TABELLE 10 (Fortsetzung 1)

Inkubations- dauer	Dauer der ^3H - Thymidineinwirkung			
	3 h	4 h	5 h	Kontrolle (ohne PHA)
D.N.				
48 h	12.181 121 1%	15.238 1.008 7%	16.946 670 4%	172 19 11%
72 h	14.734 796 5%	18.822 1.730 9%	24.244 1.538 6%	200 22 11%
96 h	15.003 1.361 9%	19.985 666 3%	27.434 4.573 17%	217 41 19%
S.E.				
48 h	6.292 3.318 53%	7.379 1.533 21%	14.593 3.737 26%	88 10 11%
72 h	13.632 1.238 9%	17.994 1.297 7%	20.873 1.788 9%	146 26 18%
96 h	16.954 2.212 13%	21.076 3.500 17%	30.409 3.538 12%	115 25 22%
S.Y.				
48 h	22.019 337 2%	26.978 2.193 8%	31.043 1.984 6%	85 19 22%
72 h	20.553 1.809 9%	30.968 608 2%	37.858 2.237 6%	87 10 11%
96 h	21.735 1.787 8%	26.016 536 3%	32.016 409 1%	111 23 21%

TABELLE 10 (Fortsetzung 2)

Inkubations- dauer	Dauer der ^3H - Thymidineinwirkung			
	3 h	4 h	5 h	Kontrolle (ohne PHA)
S.M.				
48 h	11.927	12.544	21.171	40
	1.053	2.462	4.291	13
	9%	20%	20%	33%
72 h	21.885	28.370	37.064	151
	293	3.423	5.010	26
	1%	12%	14%	17%
96 h	19.672	24.018	28.782	136
	547	1.747	2.397	54
	3%	7%	8%	40%
G.F.				
48 h	17.684	30.680	39.104	124
	6.148	1.372	1.249	13
	35%	5%	3%	10%
72 h	22.542	35.245	43.385	229
	1.303	1.370	4.267	23
	6%	4%	10%	10%
96 h	23.481	34.358	28.435	264
	5.700	727	15.624	127
	24%	2%	55%	48%

3.4.7. Abhängigkeit des Versuchsergebnisses von der
 ^3H - Thymidinkonzentration
(s. Abb. 11 und Tab. 11)

Abbildung 11 veranschaulicht anhand des Versuches 20 (Tab.11) die Dosis - Wirkungskurve für ^3H - Thymidin bei ansteigenden Konzentrationen von 0,5 bis 2 uCi .

Hier zeigt sich mit zunehmender Dosierung bei drei von vier Verlaufskurven ein geringer Anstieg der Stimulationsrate. Eine Kurve hat bei einer Konzentration von 1 uCi ihr Maximum erreicht und wird dann leicht rückläufig.

Auffallend ist vor allem die erhebliche Streuung der Meßergebnisse bei einer Konzentration von 2 uCi.

Daher halten wir eine relativ niedrige Dosierung von 1 u Ci ^3H - Thymidin (zugegeben in einem Volumen von 10 Mikrolitern) für angemessen, zumal hierbei im linearen Bereich der Kurve geblieben wird und eine wesentlich geringere Streubreite der Testergebnisse zu verzeichnen ist.

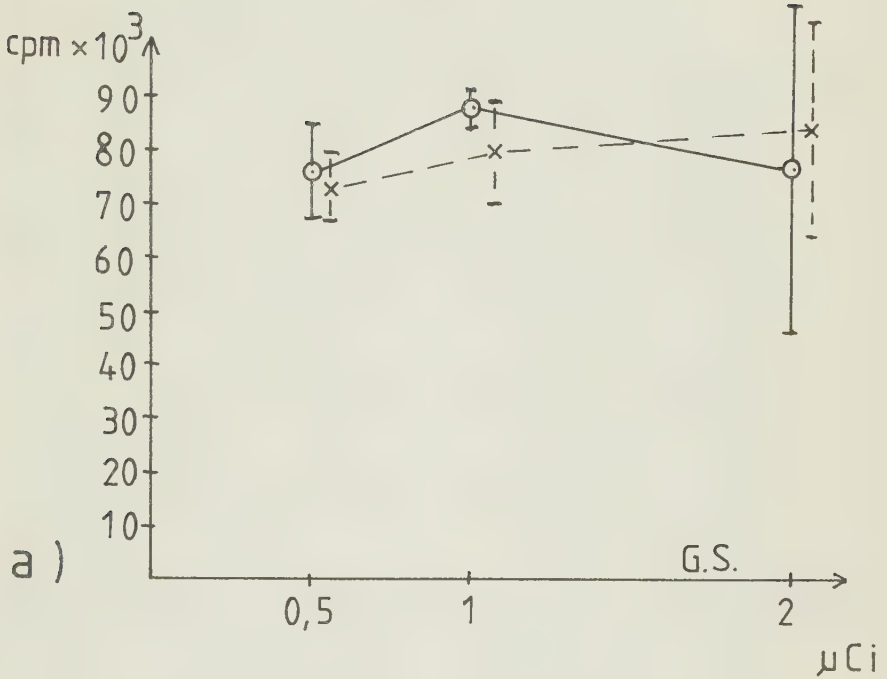


ABBILDUNG 11a

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ³H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der ³H - Thymidin - Konzentration (bei unterschiedlichem Alter des Kulturmediums)

1 Tag altes RPMI 1640 (○—○)

10 Tage altes RPMI 1640 (x--x)

(Versuch Nr. 20)

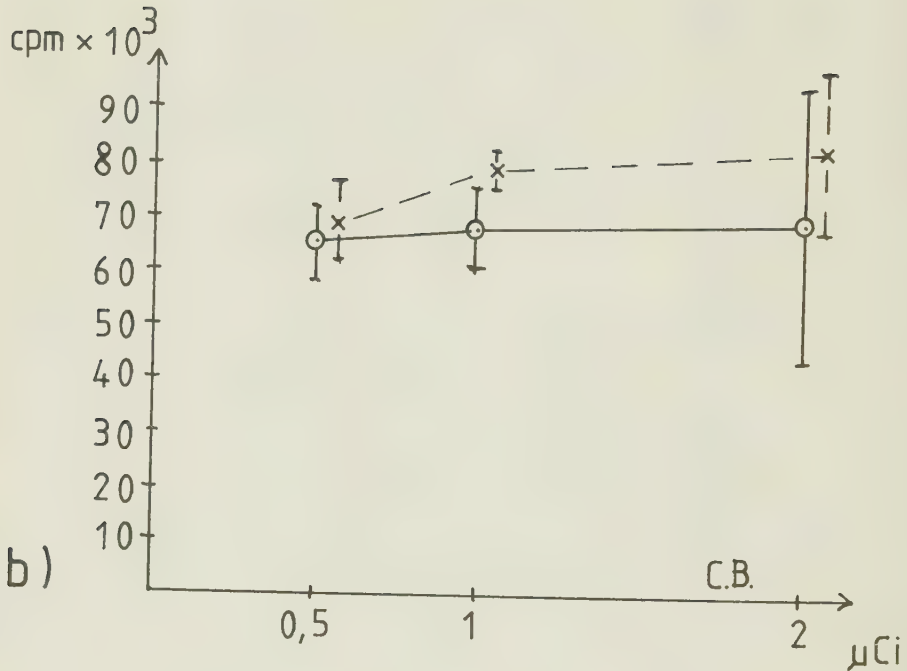


ABBILDUNG 11b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der ^3H - Thymidin - Konzentration (bei unterschiedlichem Alter des Kulturmediums)

1 Tag altes RPMI 1640 (○—○)

10 Tage altes RPMI 1640 (x—x)

(Versuch Nr. 20)

TABELLE 11

Versuch Nr. 20 (Mittelwerte aus je 6 Meßergebnissen)

Ziel: optimale ^3H - Thymidinkonzentration

Vergleich von 1 zu 10 Tage altem RPMI 1640

vorgegeben : 200.000 Lymphozyten/Kultur, 0,15 ug PHA,

Inkubation mit CO_2 (5%) für 72 h,

^3H - Thymidinzugabe nach 68 h

	^3H - Thymidin			Kontrolle (ohne PHA)
	0,5 uCi	1 uCi	2 uCi	
G.S.				
RPMI I	76.113	88.138	76.770	500
	8.344	3.067	29.601	167
	11%	3%	39%	33%
RPMI X	72.593	79.717	84.239	723
	6.019	9.113	20.287	317
	8%	11%	24%	44%
C.B.				
RPMI I	65.082	68.422	69.349	492
	7.530	6.808	24.991	124
	12%	10%	36%	25%
RPMI X	68.927	79.045	82.512	598
	7.429	3.305	15.444	126
	11%	4%	19%	21%
D.B.				
RPMI I	65.122	73.254		494
	11.438	6.414		47
	18%	9%		10%
RPMI X	70.428	87.665		643
	6.207	5.530		94
	9%	6%		15%

3.4.8. Bestimmung der Einwirkzeit von ^3H - Thymidin
(s. Abb. 12 und Tab. 10)

Da die Verarbeitung von ^3H - Thymidin (Zugabe zu den Kulturen und Ernte) innerhalb eines Arbeitstages bewältigt werden sollte, wurden Untersuchungen über Zeiträume von 3 bis 5 Stunden angelegt.

Die Ergebnisse weist Abbildung 12 (Versuch 30, Tab. 10) aus. Hiernach scheint ein Anstieg der Einbaurrate direkt proportional zur Einwirkzeit des ^3H - Thymidin zu sein.

Sieben von acht untersuchten Personen zeigen ein Maximum der Stimulationsrate nach 5 Stunden Einwirkzeit auf. Nur bei einer Person ergibt sich nach 4 Stunden ein optimales Ergebnis.

Demzufolge sehen wir unter der oben genannten Voraussetzung 5 Stunden als optimale Einwirkzeit von ^3H - Thymidin an.

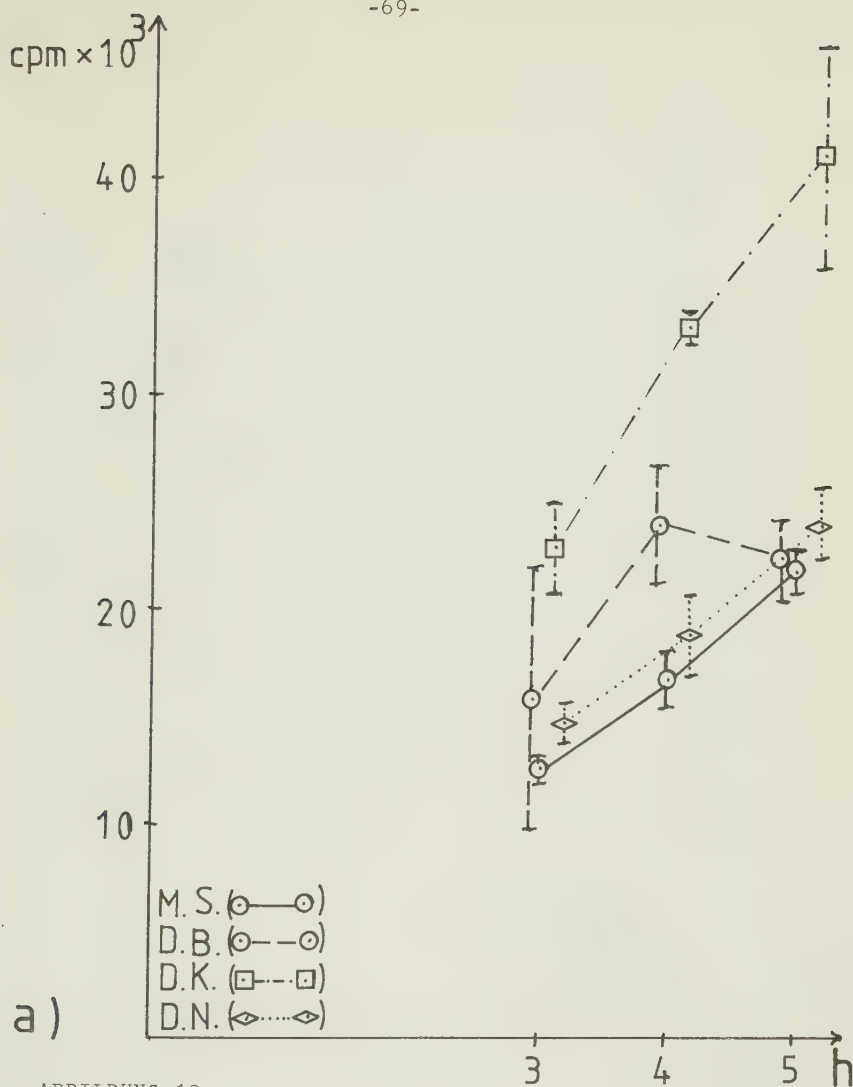


ABBILDUNG 12a

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H -Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des ^3H -Thymidin

(Versuch Nr. 30)

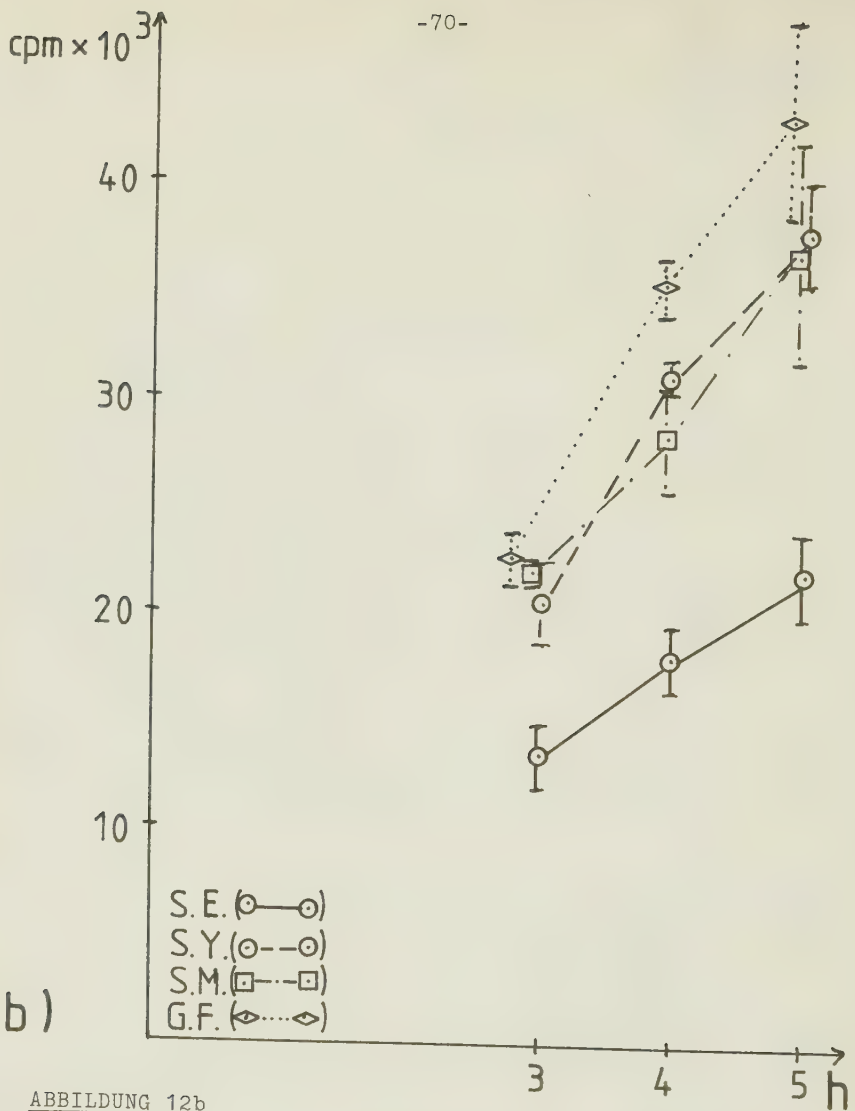


ABBILDUNG 12b

Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des ^3H - Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des ^3H - Thymidin

(Versuch Nr. 30)

3.4.9. Unterschiede zwischen Inkubation unter 5 %-iger
CO₂ - Atmosphäre und unter Normalatmosphäre
(s. Abb. 1 und Tab. 3)

In Versuch 21 werden die Stimulationsraten bei Inkubation unter 5 %-iger CO₂ - Atmosphäre mit denen unter Normalatmosphäre verglichen. Abbildung 1 stellt die Ergebnisse, die in der Tabelle 3 wiedergegeben sind, grafisch dar. Danach liegt bei allen vier Versuchspersonen der Einbau von ³H - Thymidin unter Normalatmosphäre über den Werten, die unter 5 %-iger CO₂ - Atmosphäre ermittelt werden. Daher ist gesichert, daß durch unseren Verzicht auf CO₂ - Begasung der Kulturen während der Inkubation zumindest keine schlechteren Resultate in Kauf genommen werden müssen. Offenbar ist die Pufferungskapazität des Kulturmediums ausreichend, um einem Zelluntergang während 72 - stündiger Inkubationsdauer entgegenzuwirken.

3.4.10. Verwendbarkeit von 10 Tage zuvor angesetztem
RPMI 1640
(s. Abb. 11 und Tab. 11)

In Versuch 20 werden die Hälfte der Kulturen mit 1 Tag altem RPMI 1640, die andere Hälfte mit 10 Tage altem RPMI 1640 als Grundlage des Kulturmediums angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11a und b veranschaulicht.

In Abbildung 11 a liegen die Versuchsergebnisse beider Kulturmedien so dicht beieinander, daß sie innerhalb des Bereiches der Meßtoleranz liegen. In Abbildung 11 b liegt die Kurve, die durch Verwendung des 10 Tage alten RPMI's erstellt wurde, geringfügig oberhalb der anderen.

Wegen der geringen Differenz lassen sich jedoch daraus keine Vorteile zugunsten des älteren Kulturmediums ableiten. Doch kann angenommen werden, daß durch Verwendung bis zu 10 Tage alten RPMI's keine Nachteile bezüglich der Stimulationsergebnisse zu erwarten sind.

3.4.11. Reproduzierbarkeit

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse für aufeinanderfolgende Vielfachbestimmungen ist der in den Tabellen jeweils angegebene Variationskoeffizient anzusehen.

Insgesamt finden sich in den Tabellen 3 bis 11 429 Variationskoeffizienten, die aus jeweils 3 bis 6 Einzelergebnissen gebildet wurden.

Werden alle Meßergebnisse, also auch die nicht im Stimulationsoptimum liegenden Variationskoeffizienten der Versuche 20 bis 30, betrachtet, so ergibt sich (ohne Extremwertausschluß) naturgemäß eine große Streubreite mit einem Mittel aller Variationskoeffizienten von ca. 17 % .

Betrachtet man nach Optimierung der Methode nachträglich die Ergebnisse der Versuche 29 und 30, die mit den ermittelten Variablen durchgeführt wurden, so liegt das Mittel der Variationskoeffizienten unter 10 % .

(Versuche 29 und 30 bei 4 h Einwirkzeit von ^3H - Thymidin

(mit 1 Extremwertausschluß) : $\bar{V} = 7$ (%) ,

Versuch 30 bei 5 h ^3H - Thymidineinwirkzeit (ohne Extremwertausschluß) : $\bar{V} = 9$ (%))

Somit liegt die Reproduzierbarkeit der Methode bei direkt aufeinanderfolgenden Mehrfachmessungen in akzeptablen Grenzen.

4. DISKUSSION

Die Lymphozytentransformation in vitro durch PHA hat sich als nützlicher Parameter zur Untersuchung der zellulären Immunreaktionen erwiesen (33) .

Ziel unserer Untersuchungen war, bei möglichst geringem labor-technischem Aufwand eine Mikromethode zu entwickeln, die eine gute Reproduzierbarkeit hatte und durch Austestung mehrerer Variablen maximale Stimulationsraten zuließ.

Um den Zellverlust bei der Lymphozytenseparation möglichst gering zu halten, wurde auf zusätzliche Schritte, wie die Zugabe von Carbonyl - Eisen - Pulver (23) zur Entfernung der Makrophagen, verzichtet. Nach L o h r m a n n et.al. (23) nimmt der Einfluß von Monozyten auf das Gesamtstimulationsergebnis mit steigenden Mitogendosen ab. Da unsererseits optimale Mitogenkonzentrationen angestrebt wurden, war die eventuelle Gegenwart von Monozyten in den Kulturansätzen zu vernachlässigen.

Bei der Lymphozytenseparationsmethode nach B ö y u m (2) ergaben sich durch Verzicht auf eine Kühlzentrifuge keine erkennbaren Nachteile. Nach exaktem Einstellen der Plastikröhrchen auf die geforderten 18 Grad Celsius blieb während der 35-minütigen Sedimentationsdauer durch die gute Isolation der Röhrchen und der oft geringen Differenz zur Raumtemperatur eine Aufwärmung der Röhrcheninhalte vernachlässigbar klein. Bei den erzielten Ernteergebnissen von durchschnittlich $60 \pm 14 \%$ war der Zellverlust während des zweimaligen Waschvorgangs von nicht unerheblicher Bedeutung, weshalb auf einen dritten Waschgang verzichtet wurde.

B r o w n & G r e a v e s weisen auf die Gefahren eines selektiven T - oder B- Zellverlustes hin (4) .

Dadurch entstehende Verschiebungen des T - zu B - Zellverhältnisses in vitro lassen keine ausreichend genauen Rückschlüsse auf die tatsächliche Blutzusammensetzung zu.

Mit Ausnahme der von uns benutzten Methode nach B ö y u m (?) schreiben B r o w n & G r e a v e s (4) den anderen Standardmethoden (wie z.B. Gelatine - oder Dextran - Methoden) eine selektive Anhäufung von B - Zellen zu. Dabei trete eine erhebliche Streuung der Ernteresultate auf, die unter 60 % lägen. Auch die von B ö y u m selbst angegebenen Separationsergebnisse von 97 bis 99 % konnten von B r o w n & G r e a v e s bei weitem nicht nachvollzogen werden. Dennoch sei hier eine Verschiebung des T - zu B - Zellverhältnisses durch die Separation geringer als bei den anderen Methoden.

S i n g h et. al. (43) schreiben jedoch unter anderem auch der B ö y u m s c h e n Methode eine selektive B - Zellhäufung zu. Dennoch war für uns die Methode nach B ö y u m wegen ihrer guten Ernteergebnisse das Mittel der Wahl.

Nach unseren Untersuchungen kann zur Arbeitsvereinfachung das Kulturmedium RPMI 1640 bis zu 10 Tage vor der Verarbeitung angesetzt werden ohne nachteiligen Effekt auf das Stimulationsergebnis. FBS und Penicillin / Streptomycin sollten jedoch erst kurz vor der Verwendung hinzugefügt werden.

Anders verhält es sich mit den 20 mmol Hepes, die 880 ml RPMI 1640 bereits bei der Auflösung beigegeben werden. Wie wir feststellen konnten, war die Pufferungskapazität des Mediumgemisches durch Zugabe von Hepes (Fa. Serva, Heidelberg) groß genug, um ein Überleben der Zellen in den Kulturansätzen für den Versuchszeitraum sicherzustellen. Es mag als weiterer vereinfachender Schritt unserer Methode herausgestellt werden, daß somit auf den Einsatz eines CO_2 - Inkubators verzichtet werden kann.

Wie unsere Untersuchungen bezüglich der Zellabsterberate nach 72 Stunden ohne CO_2 - Begasung (s. Tab. 2) ausweisen, liegen wir mit unseren Ergebnissen auf einer Ebene mit W i l s o n und T h o m s o n (49), die Versuche mit Lymphozytenkulturen unter 5 %-iger CO_2 - Atmosphäre durchführten.

P e e s & P a p p a s (35) verwenden als Kulturmediumzusatz entweder autologes oder Poolserum in einer Konzentration von 5 bis 10 % . Allogene Normalseren zeigen nach ihren Untersuchungen bei der Stimulation normaler Zellen große Unterschiede.

Y a m a m u r a benutzt bei seiner Methode einen 10 %-igen Zusatz von autologem Serum (50), da seiner Meinung nach fetales Kälberserum im Vergleich zu autologem Serum Faktoren enthalten kann, die die Lymphozytentransformation um bis zu 90 % verhindern.

Auch H s u und L e e v y (18) führen an, daß die Lymphozytenstimulation mit PHA durch Zusatz pathologischer Plasmazusätze und durch Kälberserum stark reduziert werden kann.

Durch Vergleich unseres Zahlenmaterials mit den Stimulationsraten der oben aufgeführten Untersuchungen konnte kein negativer Einfluß unseres Serumzusatzes von 10 % FBS (fetal bovine serum) festgestellt werden.

Nach unseren Untersuchungen ist bei einer größeren Anzahl als 200.000 Lymphozyten pro Kulturansatz (entsprechend 1×10^6 Zellen pro ml) mit einem verminderten Einbau von ^3H - Thymidin zu rechnen.

Dies deckt sich mit Y a m a m u r a s Ergebnissen (50). Während wir uns für das Maximum der Dosis - Wirkungs - Kurve entscheiden, vermindert Y a m a m u r a seine Lymphozytenzahl auf $0,2 \times 10^6$ Zellen pro ml, um in den ansteigenden, linearen Teil zu gelangen.

P e e s & P a p p a s (35) registrierten einen Anstieg des Thymidineinbaus bis zu einer Konzentration von 300.000 Zellen pro Kultur (entsprechend 15×10^5 / ml Kultur) . Danach flacht die Kurve ab, wobei sie makroskopisch eine pH - Verschiebung in den sauren Bereich feststellten.

Im Gegensatz zu Y a m a m u r a (50) und P e e s & P a p p a s (35) liegt die von uns ermittelte optimale PHA - Dosis von 0,1 ug / Kultur (entsprechend 0,5 ug / ml) niedriger. Dies mag auch unter anderem mit der Verwendung unterschiedlicher PHA - Bezugsquellen erklärt werden.

Y a m a m u r a stellt einen vermehrten Einbau von ^3H - Thymidin bis zu 1 ug PHA fest. Verminderter Einbau bei PHA - Werten über 10 ug werden der Zytotoxizität des Mitogens zugeschrieben.

Das Stimulationsoptimum für PHA liegt bei P e e s & P a p p a s (35) zwischen 5,0 und 25 ug / ml Kultur (entsprechend 1 und 5 ug / Kultur) . Als optimale Dosis werden von ihnen 25 ug / ml (5 ug / Kultur) verwendet.

Innerhalb eines Zeitraumes von 2 bis 5 Tagen stellen die meisten Untersucher einen Rückgang der mitotischen Aktivität nach PHA - Stimulation fest (21, 24, 35, 50).

Dies mag weniger darauf zurückzuführen sein, daß der Rückgang der Mitoserate mit einem Mangel an notwendigen Substanzen innerhalb des Kulturmediums in Zusammenhang steht, um eine maximale Mitoserate über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten (12). Noch mag eine Anhäufung von Metaboliten die Lymphozyten daran hindern, sich weiterhin zu teilen. Diskutiert wird die Frage, ob es nicht ein Limit in der Anzahl von Generationszyklen gibt, über das hinaus T - Lymphozyten nicht durch PHA weiter stimuliert werden können (13).

Ein Rückgang der Mitoserate nach einem Zeitraum von 72 Stunden findet auch durch unsere Versuche seine Bestätigung. Im Gegensatz zu Y a m a m u r a (50), der nach 54 Stunden einen Abfall der maximalen Mitoserate feststellt und seine weiteren Versuche mit einer Inkubationszeit von 44 Stunden durchführt, beenden P e e s & P a p p a s (35) ihre Versuche nach 66 Stunden.

Unsere Entscheidung, 1 uCi ^3H - Thymidin als Inkorporationsdosis pro Kultur einzusetzen, wurde in Übereinstimmung mit Y a m a m u r a (50) getroffen.

Unsere Versuchsergebnisse zeigten im Bereich von 0,5 bis 2 uCi ^3H - Thymidin mit steigender Konzentration einen so minimalen Anstieg der Einbaurates, daß wir 1 uCi / Kultur - auch im Hinblick auf die Kosten des ^3H - Thymidins - bei den weiteren Versuchen beibehielten.

Unsere Methode hatte neben der wissenschaftlichen Auswertung der angesprochenen Parameter auch das Ziel, daß sie später routinemäßig vom Laborpersonal durchgeführt werden konnte.

Deshalb nahm der übliche Arbeitstag von 8 Stunden Dauer Einfluß auf unsere Überlegungen bezüglich einer optimalen Einwirkzeit des ^3H - Thymidins. Viele Autoren (9, 25, 38, 48) beschränken sich ohne Verminderung der gemessenen Stimulationsraten auf Zeiten unter 6 Stunden für die Dauer der Thymidinaufnahme. Andere (5, 21, 26, 35, 44) bevorzugen längere Einwirkzeiten (16 h, 24 h und darüber). Unter den gegebenen Vorbedingungen führten wir unsere Versuche mit maximaler Stimulationsrate bei einer Einwirkzeit von 5 Stunden durch.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der oben aufgeführten Untersuchungen lassen sich dadurch keine Nachteile unserer Methode erkennen, obwohl S c h e l l e k e n s (41) längere Inkubationszeiten mit ^3H - Thymidin vorzieht, um einen größeren Anteil der asynchronen Zellpopulation in der S - Phase zu erfassen.

Wie unsere Versuche durch Mehrfachbestimmungen belegen, bewegt sich die Reproduzierbarkeit der Methode in durchaus akzeptablen Grenzen.

So mögen plötzlich auftretende Schwankungen in der Stimulierbarkeit von Lymphozyten derselben Personen eher mit einer veränderten Abwehrlage als mit einer mangelhaften Reproduzierbarkeit der Methode begründet werden.

Stark reduzierte Stimulationsraten finden sich außer bei akuter und chronischer lymphatischer Leukämie (26, 44) schon kurz vor Ausbruch akuter viraler Infekte der oberen Luftwege (35).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine Methode zur Phytohämagglutinin - Stimulation von Lymphozyten zu entwickeln, mit der bei guter Reproduzierbarkeit möglichst hohe Stimulationsraten, gemessen durch die Inkorporation von ^3H - Thymidin, erzielt werden sollten. Die Untersuchungen erfolgten in der Zeit von 1974 bis 1976 in der Universität - Kinderklinik Münster. Die Zählung der mit ^3H - Thymidin markierten Kulturen wurde im Szintillationszähler der Universitäts - Hautklinik Münster vorgenommen. Wegen der zu Anfang wiederholt benötigten Mengen Spenderblut wurden die Versuche mit gesunden Erwachsenen (15 Männer, 12 Frauen) im Alter von 19 bis 43 Jahren durchgeführt.

Die Lymphozytenseparation wurde nach der Methode von Böyum (2) vorgenommen. Die gewonnenen Lymphozyten wurden mit Kulturmedium bei einem Gesamtvolumen von 0,2 ml pro Kultur auf Falcon MicroTest II Kulturplatten angesetzt.

Aufgrund unserer Untersuchungen ergaben sich bei einer Lymphozytenzahl von 200.000 pro Ansatz optimale Bedingungen.

Nach Stimulation der Kulturen mit PHA (Wellcome Research Laboratories, lot K8463) folgte die Inkubation bei 37 Grad Celsius unter Normalatmosphäre.

Maximale Stimulationsraten fanden wir bei einer PHA - Konzentration von 0,1 μg , die den Kulturansätzen jeweils in einem Volumen von 10 Mikrolitern zugegeben wurde.

Als günstigste Stimulationszeit erwies sich eine Inkubationsdauer von insgesamt 72 Stunden.

Mehrere Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurde den Kulturen ^3H - Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham / England, Tra. 120, Batch 120) in einem Volumen von 10 Mikrolitern zugesetzt.

Wir ermittelten eine maximale Lymphozytentransformation nach einer 5-stündigen Einwirkzeit von ^3H - Thymidin .

Als für unsere Kulturbedingungen günstigste ^3H - Thymidin - konzentration ergab sich 1 uCi pro Ansatz.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersson, J. Mitogens as probes for immunocyte
Sjörnberg, O. activation and cellular
Möller, G. cooperation.
Transpl Rev 11: 131 (1972)
2. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells
and granulocytes from human
blood.
Scand J clin Lab Invest 21: 77 (1968)
3. Bretscher, P.A. A theory of self non-self
Cohn, M. discrimination.
Science 169: 1042 (1970)
4. Brown, G. Enumeration of absolute numbers
Greaves, M.F. of T and B lymphocytes in
human blood.
Scand J Immunol 3: 161 (1974)
5. Caron, G.A. Radioactive method for the
Williams, H.S. measurement of lymphocyte
Sarkany, I. transformation in vitro.
Todd, A.P. Lancet II: 1266 (1965)
6. Chalmers, D.G. Quantitation of the response of
Cooper, E.H. lymphocytes in culture to specific
Evans, C. and non-specific stimulation.
Topping, N.E. Int Arch Allerg 32: 117 (1967)
7. Coombs, R.R.A. Immunological reactions involving
Franks, D. two cell types.
Progr Allerg 13: 174 (1969)

8. Coulson, A.S.
Chalmers, D.G.
Separation of viable lymphocytes
from human blood.
Lancet I: 468 (1964)
9. Dutton, R.W.
Falkoff, R.
Hirst, J.A.
Hoffmann, M.
Kappler, J.W.
Kettmann, J.R.
Lesley, J.F.
Vann, D.
Is there evidence for a non-
antigen specific diffusable
chemical mediator from the
thymus-derived cell in the
initiation of the immune response ?
Progr Immunol: 355 (1971)
10. Fröland, S.S.
Binding of sheep erythrocytes
to human lymphocytes.
A probable marker of thymocytes.
Scand J Immunol 1: 269 (1972)
11. Gabrielsen, A.E.
Cooper, M.D.
Peterson, R.D.A.
Good, R.A.
Textbook of immunopathology.
385, 1969
- zit. n. :
Roitt, M.
Greaves, M.F.
Torrigiani, G.
Brostoff, J.
The cellular basis of
immunological responses.
Lancet II: 367 (1969)
12. Goh, K.O.
Pseudodiploid chromosomal pattern
in chronic lymphocytic leukemia.
J Lab Clin Med 69: 938 (1967)

13. Goh, K.O. Phytohaemagglutinin committed lymphocytes: the mitotic activity of the phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes.
Proc Soc Exp Biol Med
148: 1122 (1975)
14. Gowans, J.L. The immunological activities of lymphocytes.
McGregor, D.D.
Progr Allerg 9: 1 (1965)
15. Greaves, M.F. T and B lymphocytes, their origin, properties and roles in immune response.
Owen, J.J.
Raff, M.C.
Association Science Publishers, Amsterdam 1973
16. Hartog, M. The response of human leucocyte cultures to stimulation by tuberculin and phytohaemagglutinin measured by the uptake of radioactive thymidine.
Cline, M.J.
Grodsky, G.M.
Clin exp Immunol 2: 217 (1967)
17. Hartzman, R.J. Precipitation of radioactively labeled samples: a semi-automatic multiple sample precipitator.
Bach, M.L.
Bach, F.H.
Thurman, G.B.
Sell, K.W.
Cell Immunol 4: 182 (1972)
18. Hsu, C.C.S. Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma form patients with advanced alcoholic cirrhosis.
Leevy, C.M.
Clin exp Immunol 8: 749 (1971)

19. Humphrey, J.H. L. d. Immunologie: 62
White, R.G. Georg Thieme Verlag 1971
20. Janossy, G. Lymphocyte activation.
Greaves, M.F. I. Response of T and B
lymphocytes to phytomitogens.
Clin exp Immunol 9: 483 (1971)
21. Junge, U. Microtechnique for quantitative
Hoekstra, J. evaluation of in vitro lymphocyte
Wolfe, L. transformation.
Deinhardt, F. J exp Immunol 7: 431 (1970)
22. Knight, S. The transformation in vitro of
Ling, N.R. peripheral lymphocytes of some
Sell, S. laboratory animals.
Oxfiard, C.E. Immunology 9: 565 (1965)
23. Lohrmann, H.P. Cellular interactions in the
Novikovs, L. proliferative response of human
Graw, R.G.jr. T and B lymphocytes to
phytomitogens and allogeneic
lymphocytes.
J exp Med 139: 1553 (1974)
24. MacKinney, A.A. The kinetics of cell proliferation
Stohlmann, J. in cultures of human peripheral
Brecher, G. blood.
Blood 19: 349 (1962)
25. Mangi, R.J. The in vitro transformation of
Mardiney, M.R.jr. frozen-stored lymphocytes in the
mixed lymphocyte reaction and in
culture with phytohaemagglutinin
and specific antigens.
Requests for reprints to
Dr. Mardiney, Baltimore Cancer
Research Center, Building 6,
3100 Wyman Park Drive,
Baltimore, Md. 21211

34. Pappas, A.
Scheurlen, P.G.
Lymphocyte transformation -
methodical problems.
In: 1st International Symposium.
Applied Tumor Immunology,
Walter de Gruyter Publishers,
Berlin 1972
35. Pees, H.
Pappas, A.
Eine Mikromethode für die PHA-
Stimulation menschlicher
Lymphozyten.
Z Immun Forsch 150: 309 (1975)
36. Penhale, W.J.
Farmer, A.
Macculish, A.C.
Irvine, W.J.
A rapid micromethod for the
phytohaemagglutinin-induced
human lymphocyte transformation
test.
Clin exp Immunol 18: 155 (1974)
37. Playfair, J.H.L.
Cell co-operation in the immune
response.
Clin exp Immunol 8: 839 (1971)
38. Polesky, H.F.
Helgeson, M.
Viability of lymphocytes in
stored blood: Response to
phytohaemagglutinin and to
allogenic leukocytes.
J Lab Clin Med 76: 134 (1970)
39. Roitt, M.
Greaves, M.F.
Torrighiani, G.
Brostoff, J.
The cellular basis of
immunological responses.
Lancet II: 367 (1969)
40. Sample, W.F.
Chretien, P.B.
Thymidine kinetics in human
lymphocyte transformation:
determination of optimal
labelling conditions.
Clin exp Immunol 9: 419 (1971)

41. Schellekens, P.T.
Eijvoogel, V.P.
Lymphocyte transformation in vitro. I. Tissue culture conditions and quantitative measurements.
Clin exp Immunol 3: 571 (1968)
42. Schlesinger, M.
Antigens of the thymus.
Prog Allerg 16: 214 (1972)
43. Singh, J.
Taylor, R.B.
Personal communication to 4.
44. Smith, J.L.
Cowling, D.C.
Barker, C.R.
Response of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia to plant mitogens.
Lancet I: 229 (1972)
45. Stobo, J.D.
Phytohaemagglutinin and Concanavalin A.
Probes for murine T cell activation and differentiation.
Transpl Rev 11: 60 (1972)
46. Strong, D.M.
Ahmed, A.A.
Thurman, G.B.
Sell, K.W.
In vitro stimulation of murine spleen cells using a microculture system and a multiple automatic sample harvester.
J Immunol Methods 2: 279 (1973)
47. Taylor, R.
Iverson, G.M.
Hapten-competition and the nature of cell cooperation in the antibody response.
Proc Roy Soc B 176: 393 (1971)

Herrn Prof. Dr. G. Schellong danke ich für
die Überlassung des Themas und die mir ge-
währte freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. E. Macher und
Herrn Prof. Dr. C. Sorg danke ich für die
Bereitstellung des Szintillationszählers.

Herrn Dr. H. Breu danke ich für wissen-
schaftliche Anregungen und
Fräulein G. Felgner für technische Assistenz.

Frau Ingrid Hämmerling danke ich für die
Erstellung der Reinschrift des Manuskriptes.

7. LEBENSLAUF

Am 10. Dezember 1950 wurde ich, Ulrich Krefting, als Sohn des Kaufmanns Karl Friedrich Krefting und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Speckenwirth, in Altena, Märkischer Kreis, geboren.

Nach der Einschulung in die Knerling - Schule in Altena Ostern 1957 besuchte ich ab Ostern 1961 das Städtische Neusprachliche Gymnasium in Altena, an dem ich am 7. Juni 1969 das Abitur ablegte.

Nach eineinhalbjähriger Tätigkeit in der Krankenpflege im Haus Altena der Krankenhäuser des Kreises Lüdenscheid wurde ich zum Sommersemester 1971 zum Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin zugelassen. In Berlin bestand ich am 20. März 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 26. September 1973 die ärztliche Vorprüfung.

Ab Sommersemester 1974 studierte ich an der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster, wo ich am 1. Juli 1977 die ärztliche Prüfung bestand.

Vom 1. Januar 1978 an absolvierte ich meine Medizinal-assistentenzeit auf der inneren und chirurgischen Abteilung des St. Elisabeth - Hospitals in Herten.

Meine Approbation erhielt ich am 2. Januar 1979.

Ich war noch bis zur Einberufung zum Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundeswehr am 5. März 1979 in Herten tätig.

Nach Ableistung meiner Wehrdienstzeit bin ich seit dem 1. Juni 1980 auf der chirurgischen Abteilung der St. Barbara - Klinik in Hamm - Heessen tätig.

